

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**



**Facoltà di Farmacia**

**Scuola di Dottorato in Scienze Farmacologiche**

**Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari**

**IL RUOLO DELL'HUNTINGTINA NELLA FISILOGIA DEL  
DIFFERENZIAMENTO NEURONALE E NELLA PATOLOGIA**

Settore Scientifico Disciplinare: BIO/14

Tutor: Prof.ssa Elena Cattaneo

Coordinatore: Prof. Alberto Panerai

**Stefano Camnasio**

Matr. R09325

Anno accademico 2012-2013

## **Indice**

### **Scopo del lavoro**

### **Introduzione**

#### **Parte 1**

#### **Fisiologia dell'htt sana durante la neurogenesi**

1. La polarità cellulare e il suo ruolo nello sviluppo neurale
    - 1.1 Morfogenesi del tessuto neurale murino
    - 1.2 Le tre tipologie di progenitori neurali: caratteristiche comuni e peculiarità.
      - 1.2.1 I progenitori apicali neuroepiteliali.
      - 1.2.2 Glia radiale
      - 1.2.3 I progenitori basali
    - 1.3 Meccanismi di regolazione del destino dei progenitori neurali
    - 1.4 I complessi di polarità e loro interazioni
      - 1.4.1 Il complesso di PAR
      - 1.4.2 Il complesso di Crumbs
      - 1.4.3 Il complesso di Scribble
      - 1.4.4 Altre proteine coinvolte nella polarità cellulare.
    - 1.5 Meccanismi di polarizzazione cellulare e interazioni funzionali tra i complessi di polarità
  - BOX Il pathway di WNT e la polarità cellulare
  - 1.6 Livelli delle proteine di polarità e destino dei progenitori neurali
    - 1.6.1 Modulazione del complesso di Crumbs
    - 1.6.2 Modulazione del complesso di PAR e CDC42
    - 1.6.3 Altre proteine coinvolte nella regolazione del destino neurale: USP9X e Staufén
- 
2. Htt e il suo ruolo nello sviluppo neurale
    - 2.1 La proteina htt: fisiologia della proteina sana nel cervello adulto.
      - 2.1.1 Htt e il suo ruolo antiapoptotico
      - 2.1.2 Htt e trascrizione genica del BDNF
      - 2.1.3 Htt e attività sinaptica
    - 2.2 Htt e conversione neurale

2.3 Differenziamento neurale di cellule embrionali staminali murine e le rosette neurali

## **Parte 2**

### **Patologia dell'htt mutata in un modello malattia basato su cellule iPS**

3. Generazione di un modello cellulare di malattia, basato su cellule pluripotenti umane
  - 3.1 L'utilizzo di cellule pluripotenti umane come modello malattia
  - 3.2 Cellule staminali pluripotenti indotte (iPS): caratteristiche e derivazione
  - 3.3 Differenziamento neuronale di cellule pluripotenti umane
  - 3.4 La proteina htt: Meccanismi patogenetici molecolari nell'HD
    - 3.4.1 Proteolisi dell'htt mutata, formazione di aggregati e autofagia
    - 3.4.2 Alterazione della trascrizione genica
  - 3.5 I modelli malattia iPS-HD in letteratura

## **Materiali e Metodi**

## **Risultati**

### **Parte 1**

#### **Identificazione di un nuovo ruolo dell'htt sana nella definizione della polarità apico-basale durante la conversione neurale di cellule embrionali staminali**

- 1.1 L'assenza di htt causa difetti nella polarizzazione dei progenitori neurali che mimano le alterazioni dovute all'abbattimento dei livelli delle proteine di polarità.
- 1.2 L'overespressione di determinanti di polarità apicale è in grado di ripristinare, nelle cellule deplete di htt, il corretto processo di neurulazione *in vitro*.
- 1.3 L'htt sana contribuisce alla stabilizzazione dei livelli di aPKC nei progenitori apicali

1.4 Il segnale di WNT è alterato durante il differenziamento neurale di cellule  $Hdh^{ex4-5}$ .

1.5 La reversione del fenotipo *rosetteless* nelle linee complementate con CDC42 e CRB2 è associata ad un sostanziale recupero dei corretti livelli di aPKC e della riattivazione della via del segnale di WNT.

## **Parte 2**

### **Descrizione di un modello malattia, attraverso la generazione di cellule iPS da pazienti affetti da HD**

2.1 Generazione di cellule iPS da fibroblasti derivati da pazienti HD

2.2 La ripetizione del tratto CAG non interferisce con il processo di riprogrammazione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule iPS

2.3 Il differenziamento neurale di cellule HD-iPS è variabile, ma non influenzato dalla presenza della mutazione.

2.4 Validazione di fenotipi associati alla malattia, in cellule HD-iPS

## **Discussione**

## **Bibliografia**

## **Scopo della Tesi**

In questo lavoro di Tesi abbiamo voluto analizzare in maniera complementare il ruolo dell'huntingtina (htt) sana e quello della proteina mutata in contesti fisiologici e patologici. Questo perché è ormai accettato che la malattia di Huntington sia causata non solo da un *gain of function* tossico dell'htt mutata, ma anche da una *loss of function* protettiva dell'htt normale.

Dapprima abbiamo analizzato il ruolo dell'htt sana in un processo ancora poco esplorato, ma che potrebbe essere molto attraente per scoprire nuove funzioni della proteina: lo sviluppo neurale. Ad oggi è noto che l'htt, nella sua forma sana, svolge attività fondamentali nei neuroni cerebrali, suggerendo che la perdita di tali funzioni possa concorrere allo sviluppo dello stato patologico (teoria del *loss of function*). Per questo motivo è di cruciale importanza conoscere nel dettaglio le funzioni che vengono perse durante la patologia. Inoltre, sebbene la malattia di Huntington fino ad oggi sia stata descritta come una patologia ad insorgenza nell'età adulta, è molto importante capire se difetti che potrebbero colpire il normale sviluppo embrionale, possono in qualche modo contribuire ai meccanismi patogenetici.

D'altra parte è altrettanto fondamentale poter investigare grazie ad un semplice modello *in vitro*, le funzioni tossiche che la proteina mutata acquisisce (teoria del *gain of function*). Per questo motivo descriveremo la generazione e caratterizzazione di un modello-malattia ottenuto grazie alla recente tecnica di riprogrammazione somatica. Le cellule pluripotente indotte, generate grazie a questa strategia, posseggono l'esatto corredo genetico dell'individuo dal quale sono state derivate. Per questo motivo rappresentano il miglior strumento attualmente disponibile per l'indagine *in vitro* dei meccanismi patogenetici che la proteina mutata esercita sulla popolazione neuronale.

# **Introduzione**

# **Parte1**

## **Fisiologia dell'htt sana durante la neurogenesi**



## **1. La polarità cellulare e il suo ruolo nello sviluppo neurale**

Nella prima parte della Tesi verranno presentati e discussi esperimenti che rivelano un nuovo possibile ruolo dell'htt sana nel contribuire alla regolazione dei processi neurogenici precoci, attraverso una specifica interazione con proteine coinvolte nella generazione della polarità apico-basale.

Durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale dei mammiferi, vengono generati miliardi di neuroni che dovranno interconnettersi fra loro per permettere al cervello di esplicare le funzioni più evolute come la cognizione, la memoria e l'apprendimento. Anche se recentemente è stata scoperta la capacità del cervello adulto di dare origine a nuovi neuroni, specialmente in seguito a lesioni o eventi traumatici (Tzeng and Wu, 1999; Sawada and Sawamoto, 2013), praticamente tutte le cellule che compongono il sistema nervoso centrale (SNC) vengono prodotte grazie ad un processo embrionale che prende il nome di neurogenesi. Durante questa fase i progenitori neurali, presenti a livello neuroepiteliale, posseggono una spiccata polarità apico-basale. La polarizzazione cellulare è un evento cruciale per moltissimi processi biologici che vanno dalla determinazione del destino dei progenitori, al loro differenziamento, dal controllo delle divisioni simmetriche o asimmetriche ai meccanismi morfogenici embrionali. I progenitori neurali polarizzati sono in grado di dividersi dapprima simmetricamente per espandere il proprio numero in maniera esponenziale, e poi in maniera asimmetrica per dar origine ai neuroni maturi che andranno a popolare le diverse aree cerebrali.

In questa prima sezione spiegheremo dettagliatamente quali sono i meccanismi coinvolti in questo processo, introducendo i concetti che ci permetteranno poi di formulare l'ipotesi di una possibile collaborazione tra htt sana e proteine di polarità apicale nella regolazione della neurogenesi stessa.

## **1.1 Morfogenesi del tessuto neurale murino**

Durante lo sviluppo embrionale, in seguito alla fase di gastrulazione, si ha la formazione di tre foglietti germinativi: endoderma, mesoderma ed ectoderma; quest'ultimo, in seguito ad eventi di induzione, è in grado di generare il tessuto neurale che darà origine sia al sistema nervoso centrale che a quello periferico. L'ectoderma, grazie ad un processo chiamato neurulazione, genera due strutture: la piastra neurale e, successivamente, il tubo neurale. La piastra neurale si forma a partire dalla porzione dorsale dell'ectoderma, definita ectoderma neurale, in seguito ai segnali ricevuti da parte del mesoderma dorsale sottostante.

Il neuroepitelio inizialmente è composto da un foglietto di progenitori neuroepiteliali (NEP) cuboidali che compongono la piastra neurale stessa. Queste cellule posseggono caratteristiche epiteliali, come una marcata polarità apico-basale e sono caratterizzate dall'espressione di diverse molecole di adesione che permettono di tenerle saldamente unite fra loro e orientate lungo la membrana apico-laterale (Ikeda et al., 1999; Kadowaki et al., 2007). Il tubo neurale si forma in seguito all'ispessimento dei bordi della piastra neurale, i quali si muovono verso l'alto per formare le pliche neurali, mentre appare un solco a forma di U al centro della placca: le pieghe migrano verso la linea mediana dell'embrione, fino a fondersi e formare il tubo neurale (Fig. 1.1).

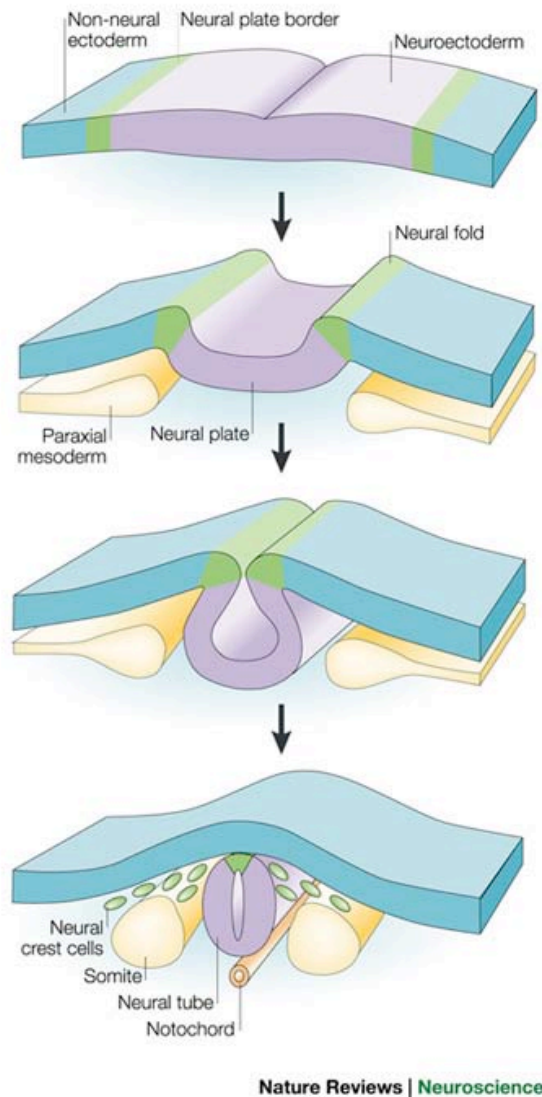


Figura 1.1 Rappresentazione schematica dello sviluppo del tubo neurale e della formazione delle cellule della cresta neurale, tratto da (Gammill and Bronner-Fraser, 2003).

Al momento della chiusura del tubo neurale il neuroepitelio è composto da un sottile foglietto che circonda la zona ventricolare del SNC. Con il proseguire dello sviluppo le cellule del neuroepitelio si dispongono lungo l'asse apico-basale e il tessuto diventa pseudostratificato; tutti i progenitori mantengono il contatto sia con la superficie ventricolare che con la membrana basale, mentre la localizzazione del nucleo è variabile lungo l'asse apico-basale (Fig. 1.2) (Sidman and Rakic, 1973). Questo processo è conosciuto come migrazione nucleare intercinetica e permette di distinguere le cellule del NEP lungo le diverse fasi del ciclo cellulare: i nuclei in fase M nella zona apicale, i

nuclei in fase S nella zona basale, i nuclei in G1 e G2 nella zona intermedia (Gotz and Huttner, 2005).

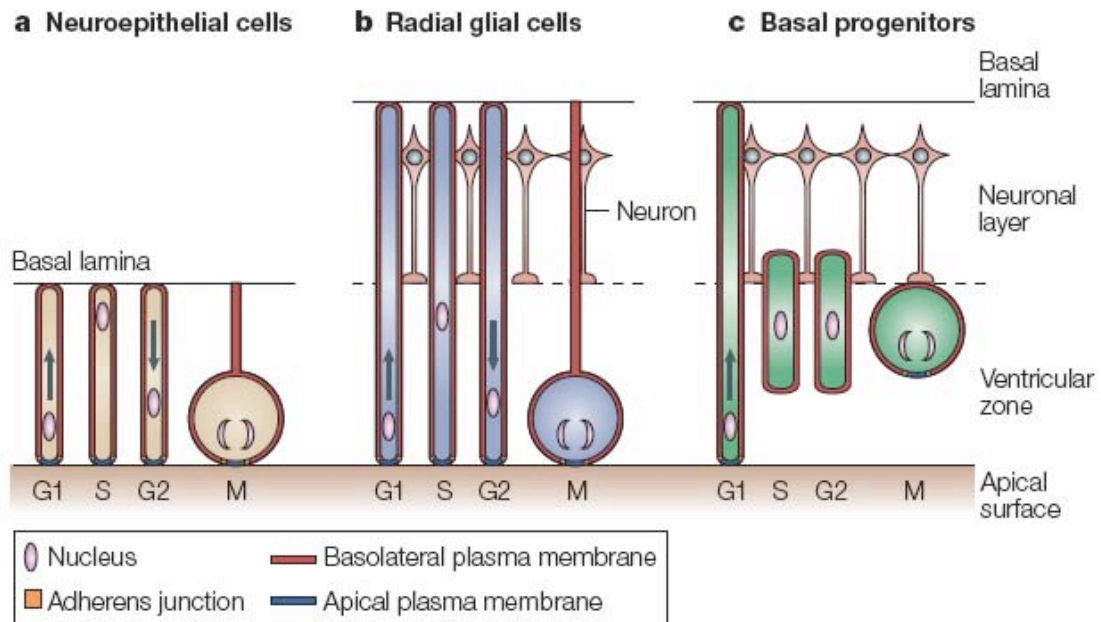


Figura 1.2 Progenitori neurali, loro contatto con la lamina apicale e basale e migrazione nucleare intercinetica. Tratto da (Gotz and Huttner, 2005).

## 1.1 Le tre tipologie di progenitori neurali: caratteristiche comuni e peculiarità

I progenitori neurali che compongono il neuroepitelio pseudostratificato possono, a questo punto, andare incontro a destini differenti e ciò dipende dal tipo di mitosi che avviene: (i) una divisione simmetrica proliferativa dove vengono generati due nuovi progenitori neurali; (ii) una divisione asimmetrica dove viene generato un progenitore e una cellula postmitotica; (iii) una divisione simmetrica neurogenica dove entrambe le cellule generate sono postmitotiche (Fig. 1.3).

Nelle fasi iniziali dello sviluppo del tubo neurale si assiste all'espansione del *pool* di progenitori grazie a divisioni simmetriche proliferative (Rakic, 1995). Dopo aver aumentato esponenzialmente il proprio numero, i progenitori neurali cambiano comportamento e seguono divisioni asimmetriche o simmetrico-neurogeniche, contribuendo in questo modo a dare origine ai primi neuroni terminalmente differenziati e ad una popolazione di progenitori basali (chiamati anche intermedi), caratterizzati da

un minor potenziale proliferativo e dall'assenza di polarità apico-basale (Fish et al., 2008).

Analizzeremo in dettaglio le caratteristiche dei diversi progenitori che compongono il SNC in via di sviluppo.

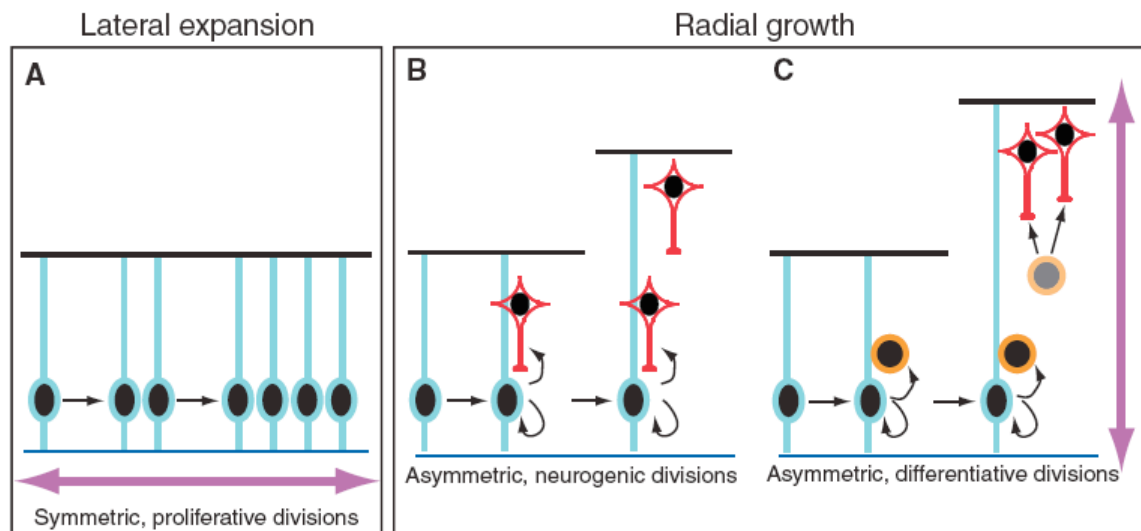


Figura 1.3 Modello di divisione cellulare nel neuroepitelio. (A) Espansione laterale esponenziale dei progenitori apicali grazie a divisioni simmetriche proliferative. (B, C) Crescita radiale che può risultare o (B) da una divisione asimmetrica neurogenica di un progenitori apicale che origina un altro progenitore e un neurone o (C) da una divisione asimmetrica differenziativa che origina un progenitore apicale e uno basale (arancione) che a sua volta si dividerà originando due neuroni. Tratto da (Fish et al., 2008).

### 1.1.1 I progenitori apicali neuroepiteliali

Come accennato precedentemente, il tessuto neuroepiteliale è caratterizzato da un singolo strato di cellule colonnari epiteliali. I NEP posseggono una spiccata polarità apico-basale (Chenn et al., 1998; Zhadanov et al., 1999). La natura polarizzata del NEP permette una distribuzione asimmetrica della membrana cellulare (Fig. 1.4): la membrana apicale, caratterizzata dalla presenza di *tight junctions*, specifiche strutture quali cilia e altre proteine di membrana quali Prominina 1, chiamata anche CD133 (Marthiens and French-Constant, 2009). Nella zona apicale si possono distinguere anche diverse proteine di polarità quali PAR3, PAR6, aPKC (Ghosh et al., 2008; Imai et al., 2006). Anche la membrana opposta basale possiede un proprio arricchimento

specifico di proteine, quali Integrina  $\alpha 6$  (Haubst et al., 2006). Sono proprio i progenitori apicali la classe cellulare contraddistinta dalla peculiare migrazione nucleare intercinetica sopra descritta. Questa popolazione è caratterizzata dall'espressione del fattore di trascrizione Sox1, il primo marcatore identificativo di identità neuroepiteliale (Wood and Episkopou, 1999), e Nestin, una proteina dei filamenti intermedi espressa poi in tutti i progenitori del SNC (Lendahl et al., 1990).

I progenitori apicali popolano il tessuto neurale e permettono l'espansione esponenziale che permetterà poi di controllare l'esatto numero di neuroni generati nella fase neurogenica.

### **1.1.2 Le cellule della glia radiale**

Le cellule staminali della glia radiale (RG) hanno la duplice funzione di progenitori neurali e di impalcatura, lungo cui migrano radialmente i neonati neuroblasti postmitotici verso i siti di destinazione (Malatesta and Gotz, 2013). Al termine della neurogenesi, le cellule della RG perdono la capacità di generare neuroni (tranne che nelle zone neurogeniche adulte) e diventano esclusivamente gliogeniche, generando gli astrociti del parenchima cerebrale adulto.

Esse sono caratterizzate dall'espressione di una serie di proteine comuni a cellule neurali staminali e astrociti quali BLBP, GLAST, GFAP, Nestin, PAX6. Inoltre è ancora identificabile una polarità apico-basale, e la migrazione nucleare intercinetica tipica dei progenitori apicali (Gotz and Huttner, 2005).

### **1.1.3 I progenitori basali**

Dopo avere espanso il proprio *pool* durante le prime fasi dello sviluppo, i progenitori apicali (e le cellule della glia radiale) danno origine ad un terzo tipo di progenitore, i progenitori basali (conosciuti anche con il nome di progenitori intermedi) (BP). Essi daranno luogo prevalentemente a mitosi di tipo simmetrico neurogenico e permetteranno la generazione dei primi neuroni maturi postmitotici che andranno a popolare gli strati superiori della corteccia cerebrale. I progenitori basali mancano completamente di una propria polarità cellulare (Fig. 1.4 ) (Attardo et al., 2008) e solo

in circa il 10% dei casi possono dar luogo ad un'ulteriore divisione proliferativa (Noctor et al., 2004).

I progenitori basali sono generati in seguito ad una divisione asimmetrica di un progenitore apicale e perdendo contatto dalla membrana ventricolare, migrano verso la zona basale (Attardo et al., 2008). In seguito alla perdita di contatto con la zona apicale, il BP diventa tondeggiante e privo di una propria polarità. Proprio quest'ultima caratteristica potrebbe spiegare l'arricchimento di mitosi simmetriche.

Alcuni tipici marcatori di BP sono, tra i vari, TBR2, CUX2 e SVET1, i quali verranno poi ereditati anche da diversi neuroni postmitotici corticali.

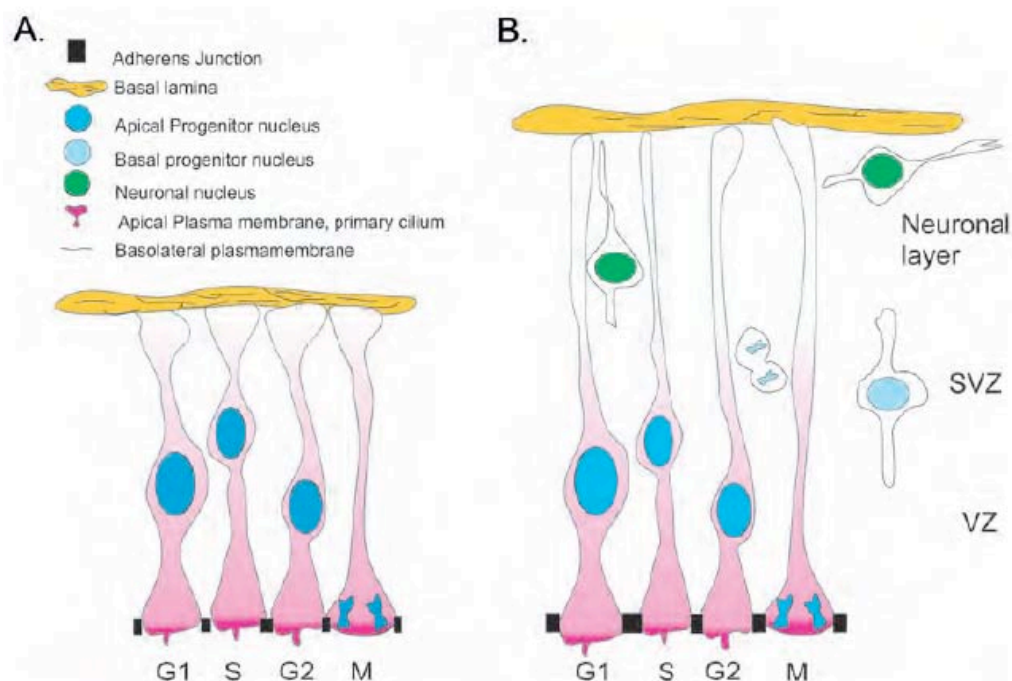


Figura 1.4 Rappresentazione schematica delle diverse popolazioni di progenitori neurali. (A) I progenitori apicali prendono contatto con la membrana apicale e basale formando un epitelio pseudostratificato. In figura è ancora mostrato la migrazione nucleare intercinetica. (B) La glia radiale possiede un processo molto allungato e il fenomeno della migrazione intercinetica è osservabile tra la zona ventricolare (VZ) e quella subventricolare (SVZ). Il progenitore basale perde la polarizzazione apico basale, diventa tondeggiante e si divide simmetricamente nella SVZ per dar origine a due neuroni, esaurendo il proprio *pool*. Tratto da (Taverna and Huttner, 2010).

## 1.2 Meccanismi di regolazione del destino dei progenitori neurali

I modelli di divisione simmetrica o asimmetrica sono definiti sulla base della distribuzione omogenea o sbilanciata di vari determinanti cellulari durante la mitosi. Durante una mitosi simmetrica proliferativa di un progenitore neuroepiteliale altamente polarizzato, il piano di divisione deve precisamente bisecare la membrana apicale, che costituisce appena circa il 2% della membrana citoplasmatica (Huttner and Brand, 1997; Kosodo et al., 2004). In questo tipo di divisione il piano di sezione deve essere verticale e perpendicolare alla superficie del ventricolo. Al contrario, durante le divisioni di tipo asimmetrico, che ricordiamo danno origine ad un progenitore ed un neurone, solo una cellula figlia eredita la porzione di membrana apicale, quella in grado di far mantenere l'identità di progenitore (Noctor et al., 2004). Ciò avviene quando il piano di divisione è orizzontale oppure non perfettamente ortogonale alla superficie apicale (Chenn et al., 1998; Miyata et al., 2004).

Già queste evidenze ci suggeriscono che probabilmente alcuni fattori in grado di mantenere il *self-renewal* delle cellule neurali sono costituenti intrinseci della regione più apicale dei progenitori neurali (Gotz and Huttner, 2005). Numerosi lavori hanno confermato, infatti, la stretta correlazione che esiste tra polarità, orientamento del fuso mitotico e destino cellulare e inoltre tali meccanismi sono altamente conservati durante l'evoluzione (Knoblich, 2008; Wodarz and Huttner, 2003).

E' ormai accettata la teoria secondo la quale in una divisione simmetrica proliferativa entrambe le cellule figlie ereditano la porzione apicale della cellula madre e ciò include le proteine di polarità e i complessi di adesione che permettono l'ancoraggio alla superficie ventricolare (Fig. 1.5). I segnali di *self-renewal* localizzati apicalmente permettono il mantenimento di uno stato neurale staminale indifferenziato. Quando invece l'orientamento del fuso mitotico non è ortogonale al ventricolo, una cellula figlia non eredita nessuna porzione di membrana apicale, perdendo (i) la capacità proliferativa, (ii) i complessi di adesione. Per questo motivo perde contatto dalla superficie ventricolare e migra verso la zona intermedia (Gotz and Huttner, 2005).

In accordo con questo modello, una perdita della polarità cellulare a livello neuroepiteliale causa alterazioni nel controllo del destino cellulare. Esiste infatti, una pletora di evidenze sperimentali che suggeriscono che la manipolazione dei livelli di proteine di polarità può alterare notevolmente le capacità proliferative dei progenitori neurali e il controllo del loro differenziamento. Nel capitolo successivo analizzeremo



nel dettaglio l'effetto di tali manipolazioni e il ruolo fondamentale delle proteine di polarità apicale nel controllo del *self-renewal*.

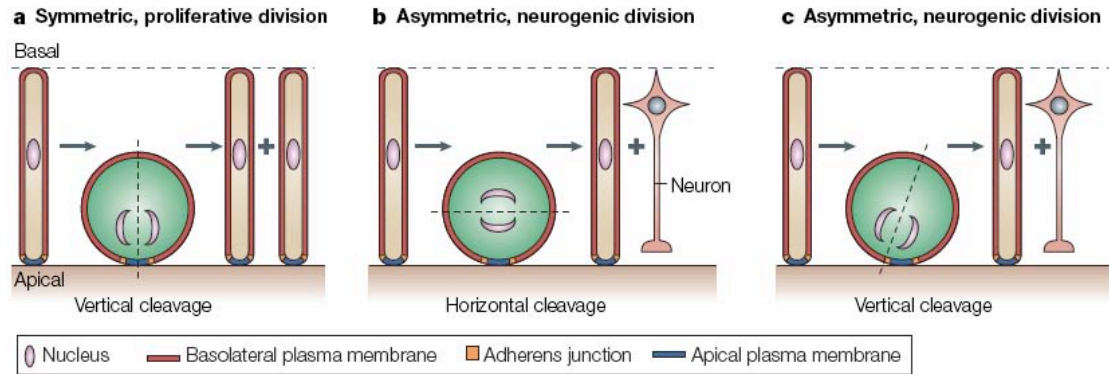


Figura 1.5 Meccanismo di divisione simmetrico e asimmetrico di cellule neuroepiteliali e della glia radiale. (A) Se il piano di divisione è ortogonale al ventricolo si ottiene una divisione simmetrica proliferativa e le cellule figlie ereditano in egual misura la componente apicale della cellula madre. (B, C) Se il piano di divisione è orizzontale (B) o obliquo (C) si assiste ad una divisione asimmetrica neurogenica in cui solo una cellula figlia eredita la componente di membrana apicale fondamentale per il mantenimento di un'identità di progenitore neuroepiteliale cicliante. Tratto da (Gotz and Huttner, 2005).

## 1.4 I complessi di polarità e loro interazioni

La polarità cellulare è un aspetto fondamentale per la cellula ed è coinvolta in un complesso meccanismo di definizione e regolazione funzionale di specifici domini nella membrana cellulare e nel citoplasma. La disposizione spaziale e la composizione delle proteine di tali domini regola ed influenza processi cellulari essenziali quali la proliferazione e il differenziamento cellulare (Gotz and Huttner, 2005; Doe, 2008; Peyre and Morin, 2012).

La polarità cellulare si riferisce a differenze spaziali nella forma, struttura e funzione della cellula; regola processi biologici tra cui le divisioni cellulari asimmetriche, la migrazione cellulare, la definizione ed il mantenimento della polarità apico-basale nelle cellule epiteliali (Drubin and Nelson, 1996). Quasi tutti i tipi cellulari mostrano una sorta di polarità, che consente loro di svolgere funzioni specializzate; la disgregazione di tale polarità può causare profondi difetti sia alla singola cellula sia all'intero organismo.

Un tipo di cellula che mostra una marcata polarità è la cellula epiteliale, la quale riveste ruoli essenziali in organismi pluricellulari, formando barriere fisiologiche e meccaniche e controllando anche l'architettura tissutale (Rodriguez-Boulau and Nelson, 1989; Nelson and Hammerton, 1989).

Studiando la cellula polarizzata epiteliale è possibile identificare 4 distinti domini della membrana citoplasmatica:

- membrana apicale: collabora nell'assunzione di acqua e nutrienti dall'ambiente extracellulare e nel rilascio di sostanze di rifiuto, con il fine ultimo di proteggere l'ambiente interno cellulare;
- membrana apico-laterale: regola il contatto intercellulare, l'adesione e la comunicazione cellula-cellula, mediata da molecole di adesione cellulare e complessi giunzionali collegati al citoscheletro di actina (dire che proteina è;
- membrana laterale: controlla la ricezione dei segnali e l'arrivo di ormoni o fattori di crescita, oltre che la generazione dei gradienti ionici;
- membrana basale: ha funzioni nel contatto cellula-matrice.

Più semplicemente, la descrizione delle membrane polarizzate è spesso limitata alla distinzione tra membrana apicale e tutte le altre membrane, identificate come membrane baso-laterali.

In questa definizione, l'esistenza di giunzioni cellula-cellula, in particolar modo di giunzioni occludenti (o serrate), permette di distinguere il confine tra questi due differenti domini, quello apicale e quello baso-laterale (Miyoshi and Takai, 2005).

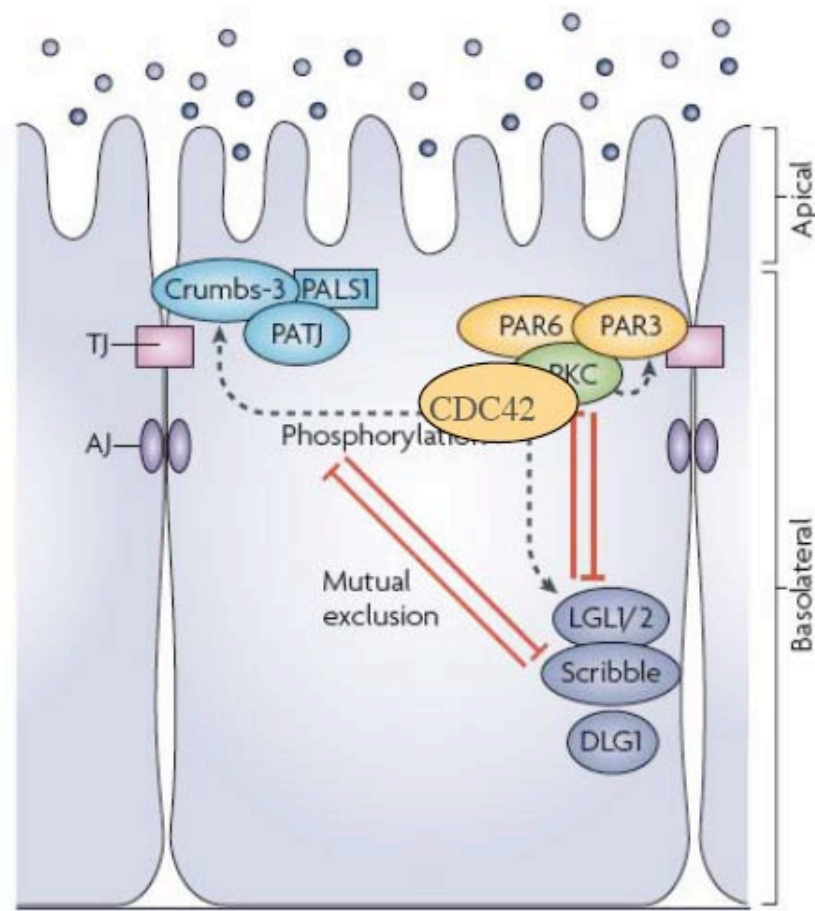


Figura 1.6 Rappresentazione delle giunzioni cellulari e delle membrane citoplasmatiche presenti in una cellula epiteliale. Le giunzioni occludenti, dette anche serrate (TJ, Tight Junctions) permettono di identificare il confine tra membrana apicale (in rosso) e membrana baso-laterale (in blu). Un altro tipo di giunzioni cellulari, coinvolte nella definizione della polarità nella cellula epiteliale, è rappresentato dalle giunzioni aderenti (AJ, Adherens Junctions) le quali sono localizzate a livello della membrana baso-laterale. Tratto da (Iden and Collard, 2008).

I meccanismi implicati nella definizione della polarità cellulare sono altamente conservati (Assemet et al., 2008) e, proprio per questo motivo, i primi studi svolti per identificare e caratterizzare i complessi proteici coinvolti furono svolti in modelli dotati di una elevata semplicità strutturale quali *Caenorhabditis Elegans* e *Drosophila Melanogaster* (Tabella 1.1). Sebbene numerose proteine partecipino a definire la polarità apico/basale nella cellula, è stato possibile individuare tre principali complessi proteici di polarità: il complesso di PAR, il complesso di Crumbs e il complesso di Scribble (Fig. 1.6).

<i>Caenorhabditis Elegans</i>	<i>Drosophila Melanogaster</i>	Mammiferi
PAR3	Bazooka	PAR3, PAR3L
PAR6	Par6	PAR6A - PAR6D
PKC3	aPkc	PKC $\iota/\lambda$ , PKC $\zeta$
CDC42	CDC42	CDC42
CRUMBS	Crumbs	CRB1 - CRB3
STARDUST	Stardust	PALS1
PATJ	Patj	PATJ, MUPP1
LGL	Lethal giant larvae (Lgl)	LGL1, LGL2
DLG	Discs large (Dlg)	DLG1 – DLG3, SAP97
SCRIBBLE	Scribble (Scrib)	SCRIB1

Tabella 1.1 Proteine coinvolte nella definizione e regolazione della polarità apico-basale ed i loro corrispettivi nomi nelle diverse specie studiate (*C.Elegans*, *D. Melanogaster*, Mammiferi).

#### 1.4.1 Il complesso di PAR

Il complesso di PAR, inizialmente descritto nel nematode *C.Elegans* e successivamente nel moscerino della frutta *D. Melanogaster* e nei vertebrati, è composto da due proteine *scaffold*, PAR6 e PAR3, e da una protein-chinasi atipica, aPKC (Fig. 1.7).

Il complesso di PAR svolge un ruolo chiave nella polarità apicale, nella formazione delle giunzioni e nella regolazione delle divisioni cellulari asimmetriche.

Nei mammiferi sono state identificate tre proteine PAR6 codificate da tre differenti geni (*PARD6A*, *PARD6B* e *PARD6G*): PAR6A/C, PAR6B e PAR6D/G. Tutte e tre le proteine hanno un simile peso molecolare (37 kDa), analoga funzione e contengono tre domini altamente conservati, fondamentali per la loro interazione con gli altri membri del complesso. Sebbene le tre proteine PAR6 siano strutturalmente simili, esse mostrano differente espressione nei vari tessuti e diversa distribuzione subcellulare; solamente PAR6A è stata identificata a livello del cervello, in particolar modo a livello sia delle giunzioni serrate sia a livello del citosol nelle cellule neuroepiteliali.

Studiando i domini presenti nelle varie isoforme di PAR6 e le possibilità di interazione con gli altri membri dei vari complessi di polarità, Yamanaka e collaboratori sono giunti a comprendere come questa proteina funga da ponte molecolare attraverso il quale aPKC può interagire con PAR3, nei siti di formazione delle giunzioni cellulari e, con LGL, nei domini baso-laterali (Yamanaka et al., 2003).

PAR3, altro membro del complesso, è codificata da due geni: *PAR3A* e *PAR3B*. Il primo codifica per tre proteine di differente peso molecolare (180 kDa, 150 kDa, 100 kDa), contenenti un dominio PDZ (*post-synaptic density-95/disc large/zonula occludens1*) che permette l'interazione con PAR6. Il secondo gene codifica per un'unica proteina, PAR3B, il cui peso molecolare è di 140 kDa. PAR3A è ampiamente espressa in differenti tessuti, mostrando elevati livelli di espressione anche nelle cellule neuroepiteliali a livello celebrale, dove solamente le isoforme di 180 kDa e 150 kDa sono presenti. Differentemente, PAR3B è poco espressa nel cervello. PAR3A e PAR3B sono parzialmente localizzate a livello apicale, nelle regioni di contatto cellula-cellula durante il processo di polarizzazione e sono coinvolte nel reclutamento delle proteine necessarie per la formazione delle giunzioni, quali PAR6 o aPKC. Molti studi mostrano infatti, che una sovra-espressione o una deplezione di PAR3A genera una distruzione delle giunzioni occludenti, una delocalizzazione di PAR6, aPKC e dei marcatori di giunzioni serrate (Mizuno and Ohno, 2006).

Nei mammiferi, due geni *aPKC $\lambda$*  e *aPKC $\zeta$*  codificano per due differenti proteine (75 kDa) che, a differenza delle forme convenzionali PKC, sono le uniche ad avere il dominio N-terminale in grado di interagire correttamente con PAR6. Entrambe le isoforme sono ampiamente espresse nel cervello. L'unico dominio conservato fra le

diverse proteine PKC è il dominio catalitico, presente nella regione C-terminale; esso è responsabile della fosforilazione di diverse proteine tra cui PAR3 e LGL.

Yamanaka e collaboratori hanno dimostrato che sia LGL che PAR3 possono formare complessi indipendenti con aPKC/PAR6 al fine di regolare la polarità cellulare (Yamanaka et al., 2003). L'attività chinasi di questa protein-chinasi è fondamentale per la formazione delle giunzioni occludenti: la sua attivazione ne permette la traslocazione dal nucleo al citoplasma e nelle regioni apicali. La successiva interazione dei domini N-terminali di PAR6 e aPKC permette, al dimero generato, di controllare gli eventi cruciali per la formazione delle giunzioni occludenti (Noda et al., 2001; Gopalakrishnan et al., 2007).

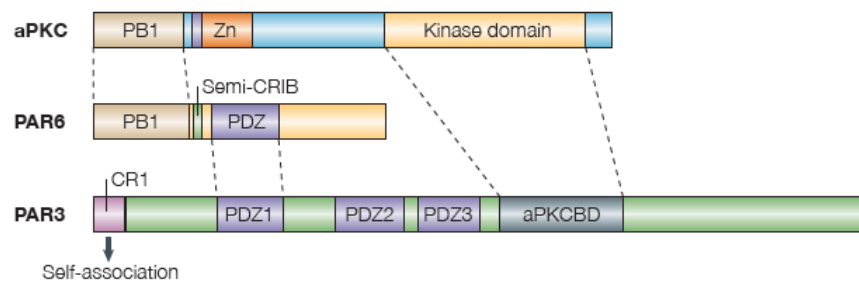


Figura 1.7 Proteine del complesso di PAR e rappresentazione delle loro interazioni e dei domini coinvolti. Immagine tratta da "Parsing the polarity code", (Macara, 2004).

### 1.4.2 Il complesso di Crumbs

Nei mammiferi il complesso di Crumbs è costituito da tre differenti proteine: CRB, proteina transmembrana, PALS1 e PATJ, proteine citoplasmatiche (Fig. 1.8).

Sono state identificate tre diverse isoforme di proteine Crumbs: CRB1 (154 kDa) e CRB2 (134 kDa), prevalentemente espresse nella retina e nel cervello, e CRB3 (13 kDa) presente nei muscoli scheletrici ed in tutti i tessuti epiteliali. Queste diverse localizzazioni suggeriscono l'esistenza di funzioni specializzate specifiche nelle diverse regioni di espressione. Tale proteina è prevalentemente esposta nell'ambiente extracellulare e possiede una corta regione citoplasmatica di soli 37 aminoacidi. Questo piccolo dominio è però cruciale per le funzioni di CRB, poiché è stato dimostrato che una mutazione in questa coda citoplasmatica porta ad una completa perdita di attività (Wodarz and Huttner, 2003).

In *Drosophila*, Crumbs contribuisce a stabilizzare le giunzioni cellulari a livello apicale e, negli ultimi anni, molti studi hanno dimostrato un simile ruolo di questa proteina anche nei mammiferi.

PALS1 (*Protein associated with Lin-7*), nota anche come MPP5 (196 kDa), è l'omologo nei mammiferi della proteina Stardust studiata nella *Drosophila*; è prevalentemente espressa a livello della placenta e dei reni, ed in maniera minore nel cervello, nel cuore e nel muscolo scheletrico. Roh e collaboratori hanno stabilito che questa proteina ha il compito principale di mediare l'interazione indiretta tra CRB e PATJ1, tutti membri dello stesso complesso proteico (Roh et al., 2002). Il silenziamento del gene codificante per PALS1 genera difetti nella polarità e nella formazione delle giunzioni occludenti, oltre che una non corretta localizzazione delle giunzioni aderenti (Straight et al., 2004; Wang et al., 2007). Poiché la presenza di PALS1 nei tessuti epiteliali dipende dall'interazione con PATJ1, sembra inoltre possibile che la stabilità di queste due proteine dipenda dalla loro diretta interazione.

Nei mammiferi, PATJ1 (*Pals1-associated tight-junction protein*) è uno dei due omologhi della proteina Dpatj, identificata nella *Drosophila* da Bhat e collaboratori (Bhat et al., 1999). Essa è prevalentemente espressa nei tessuti epiteliali e sembra essere coinvolta nello stabilizzare le giunzioni occludenti cellulari (Michel et al., 2005; Shin et al., 2005); la sua assenza porta, inoltre, a difetti nella distribuzione degli altri membri del complesso di Crumbs (CRB3 e PALS1), i quali non possono così accumularsi a livello della membrana apicale e delle giunzioni occludenti. Questi dati suggeriscono che PATJ1 provvede ad un collegamento tra i componenti laterali (Occludina e ZO-3) e apicali (PALS1 e CRB3) delle giunzioni occludenti, oltre che a stabilizzare l'intero complesso di Crumbs (Michel et al., 2005).

L'altro omologo di PATJ1 è MUPP1 (219 kDa): questa proteina mostra un'elevata affinità con PATJ1 ed anch'essa si trova altamente concentrata a livello delle giunzioni occludenti. MUPP1 è collegata al complesso di Crumbs attraverso il suo legame con PALS1, la cui funzione è quella di connettere CRB1 con PATJ/MUPP1 (Roh et al., 2002).

LIN-7, nota anche come Mals, è una proteina che interagisce con PALS1 e da cui essa prende nome (PALS – *Protein associated with Lin-7*). Sembra anch'essa coinvolta nel mantenimento della polarità apico-basale e alcuni studi la ritengono implicata nel processo di neurogenesi durante lo sviluppo della corteccia cerebrale. Una perdita di tale proteina compromette la corretta polarità apico-basale, genera difetti nella definizione

delle giunzioni occludenti e impedisce la giusta localizzazione apicale di proteine di polarità quali PALS1 e PATJ1 (Srinivasan et al., 2008).

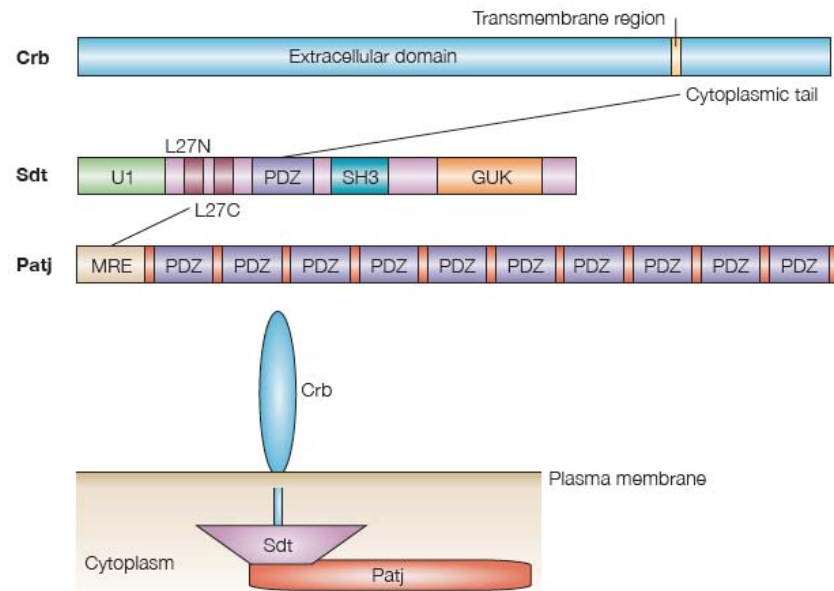


Figura 1.8 Rappresentazione del complesso di Crumbs e delle interazioni tra i tre componenti: Crb (CRB), Std (PALS1) e Patj (PATJ1). Immagine tratta da “Parsing the polarity code”, (Macara, 2004).

### 1.4.3 Il complesso di Scribble

SCRIB, LGL e DLG mostrano sequenze e funzioni simili a quelle dei loro omologhi studiati in *Drosophila*. Anche nei mammiferi queste tre proteine del complesso sono localizzate nella porzione baso-laterale delle cellule epiteliali (Fig. 1.9).

SCRIB (175 kDa) è una proteina citoplasmatica di elevate dimensioni, contenente una sequenza ricca in Leucina (LRR, *Leucine rich repeats*) che regola la sua corretta localizzazione nella cellula a livello baso-laterale (Navarro et al., 2005). Questa proteina è in grado di legarsi, nelle cellule non ancora polarizzate, direttamente a ZO-2 (Zonula Occludens 2), un marcatore di giunzioni occludenti, mentre nelle cellule polarizzate co-localizza con  $\beta$ -catenina, un marcatore di giunzioni aderenti.

Una perdita di funzionalità della proteina SCRIB causa un difetto nella corretta formazione delle giunzioni occludenti e difetti nella morfologia della cellula epiteliale, a causa di una scorretta distribuzione delle proteine di polarità a livello apicale (Bilder and Perrimon, 2000; Qin et al., 2005). Questi dati indicano che una delle funzioni



principali della proteina SCRIB, nell'ambito della polarità cellulare, sia di escludere le proteine apicali (soprattutto il complesso di Crumbs) dalle regioni baso-laterali.

Esistono 5 diverse isoforme della proteina DLG (*lethal disc large*), di differente peso molecolare, ma tra tutte, DLG1 mostra maggior similarità con l'omologo studiato precedentemente nella *Drosophila*. Bohl e collaboratori hanno studiato il ruolo di questa proteina dimostrandone il suo coinvolgimento nella formazione delle giunzioni occludenti delle cellule epiteliali (Bohl et al., 2007). Laprise precedentemente aveva collegato questa proteina alle giunzioni aderenti ed al loro ruolo di riorganizzazione del citoscheletro (Laprise et al., 2002). Nella membrana baso-laterale, al di sotto delle giunzioni aderenti, si trovano gli ultimi membri di questo complesso proteico: LGL1 (115 kDa) e LGL2 (113 kDa) (*lethal giant larvae*).

Una sovra-espressione di LGL1/2 durante la fase di polarizzazione della cellula epiteliale, compromette la formazione dei complessi giunzionali; mentre non si assiste ad alcun effetto se la stessa sovra-espressione viene ripetuta in una cellula matura polarizzata (Yamanaka et al., 2003). La localizzazione di questa proteina, a livello baso-laterale, dipende strettamente dalla sua fosforilazione mediata da aPKC; la mancata fosforilazione localizza la proteina a livello della membrana apicale (Musch et al., 2002).

Lo stesso autore suggerisce un contributo di LGL nella polarità cellulare, attraverso la regolazione dell'esocitosi polarizzata baso-laterale nelle cellule epiteliali.

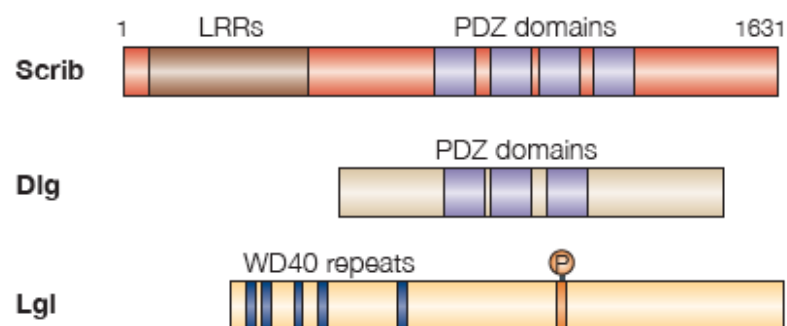


Figura 1.9 Rappresentazione del complesso di Scribble e dei tre componenti: Scrib (SCRIB1), Dlg (DLG1) e Lgl (LGL1). Immagine tratta da “Parsing the polarity code”, (Macara, 2004).

#### **1.4.4 Altre proteine coinvolte nella polarità cellulare: CDC42, N-Caderina e $\beta$ -Catenina**

A questa complessa regolazione della localizzazione ed attivazione delle proteine di polarità, si aggiunge CDC42 (*Cell Division Cycle 42*), una proteina appartenente alla famiglia delle Rho-GTPasi (Etienne-Manneville et al., 2005; Lin et al., 2000).

Studi di localizzazione in embrioni da E10 a E16, rivelano un'elevata presenza di questa proteina nella porzione apicale della corteccia cerebrale, in particolar modo nella regione ventricolare, giustificabile con la sua diretta interazione con i componenti del complesso di PAR (Cappello et al., 2006).

I membri appartenenti alla famiglia delle Rho-GTPasi possono esistere in due diversi stati: la forma attiva, che lega una molecola di GTP, ed una forma inattiva, che lega una molecola di GDP. La regolazione dell'attività di queste proteine risulta essere notevolmente complessa e dipendente da molteplici segnali. Studi relativi alla formazione delle giunzioni cellula-cellula, hanno evidenziato che il processo di dimerizzazione delle E-caderine e l'iniziale maturazione delle giunzioni aderenti stimolano l'attivazione di CDC42 (Kim et al., 2000; Fukuhara et al., 2004). CDC42-GTP induce la corretta localizzazione di PAR6 e aPKC e la successiva attivazione di questa chinasi.

Recenti studi indicano che le Rho-GTPasi collaborano con le proteine di polarità nelle cellule epiteliali e nei fibroblasti, per controllare la loro corretta localizzazione ed attivazione.

N-caderina è una molecola di adesione cellulare, appartenente alla famiglia di CAM (Cell Adhesion Molecule)  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendenti; è una glicoproteina integrale presente nella membrana plasmatica delle cellule nervose, cellule del miocardio e del muscolo scheletrico. Questa proteina media importanti processi di riconoscimento ed adesione tra le cellule, oltre a ricoprire un ruolo fondamentale nello sviluppo embrionale: durante le fasi precoci di sviluppo, le cellule derivanti dalle prime divisioni cellulari devono aderire tra loro man mano che si organizzano a formare i tessuti. L'adesione cellulare è mediata dall'associazione testa contro testa tra dimeri di caderina presenti nelle membrane plasmatiche di cellule adiacenti.

$\beta$ -catenina è una subunità del complesso proteico della caderina, caratterizzata da una serie di domini aminoacidici con capacità di omo-eterodimerizzazione. Tale proteina svolge numerose funzioni: è necessaria per la stabilità del citoscheletro e delle giunzioni

intercellulari, dove interagisce con la caderina o con l' $\alpha$ -catenina. Inoltre, svolge un ruolo di fattore trascrizionale nella via del segnale di WNT, un regolatore essenziale della polarità cellulare:  $\beta$ -catenina riveste una funzione importante come determinante polare, localizzandosi nella porzione apicale delle cellule insieme ai tipici complessi apicali di polarità (Fig. 1.10).

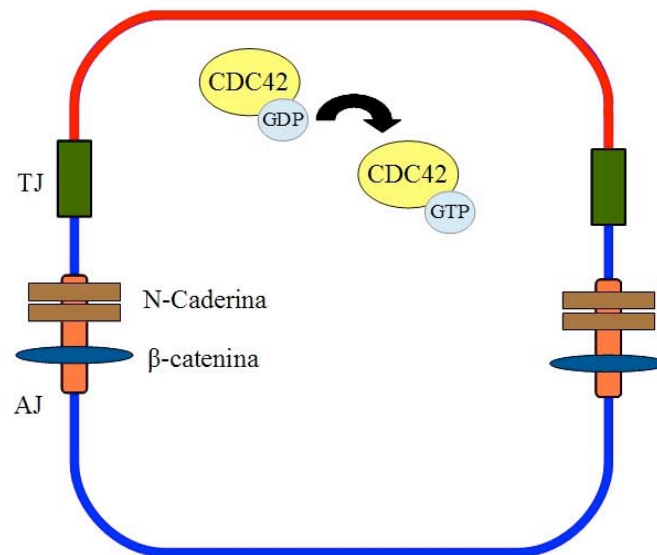


Figura 1.10 Rappresentazione del processo di attivazione della proteina CDC42 e localizzazione delle proteine N-Caderina (marrone) e  $\beta$ -catenina (blu) nelle giunzioni aderenti (AJ) della cellula epiteliale.

## 1.5 Meccanismi di polarizzazione cellulare e interazioni funzionali tra i complessi di polarità

La formazione e il mantenimento della polarità apico-basale nella cellula epiteliale richiede una coordinazione spazio-temporale dell'attività dei tre complessi precedentemente descritti.

Forti evidenze genetiche in *Drosophila* e studi biochimici su cellule di mammifero, rivelano l'interdipendenza dei complessi di polarità e la loro connessione per mezzo di numerose interazioni, anche di differente natura, tra proteina e proteina.

Inizialmente PAR3 localizza a livello delle giunzioni aderenti nascenti ed è necessaria per il posizionamento del complesso di Crumbs nella membrana apicale.

Le funzioni di tale complesso sono opposte a quelle del complesso di Scribble: il primo regola l'espansione del dominio apicale e il mantenimento della corretta localizzazione del complesso di PAR; il secondo, invece, ne inibisce la funzione e promuove l'espansione del dominio baso-laterale.

In generale, il complesso di Scribble restringe la localizzazione del complesso di Crumbs e il complesso di PAR nella regione apicale della cellula, dove essi agiscono insieme nel regolare la formazione delle giunzioni occludenti.

Durante la formazione dei primi contatti cellula-cellula, sono presenti solamente i complessi nascenti di adesione cellulare (Miyoshi and Takai, 2005); a livello di questi siti avvengono le prime interazioni tra le proteine transmembrana appartenenti alla famiglia della Nectina.

Queste interazioni portano alla formazione delle giunzioni aderenti ed al reclutamento dei componenti delle giunzioni occludenti: le proteine JAM (*Junction Adhesion Molecules*) (Fig. 1.11).

La connessione tra cellule, derivanti da questi meccanismi, rappresenta l'informazione necessaria per stabilire la polarità cellulare, che si traduce nell'iniziale formazione e successiva localizzazione apicale del complesso PAR3/PAR6/aPKC.

PAR3, nelle cellule non ancora polarizzate, si trova a livello dei siti nascenti di adesione cellula-cellula attraverso l'interazione con le proteine JAM-1 e Nectina-1/3; non è ancora complessata al dimero aPKC/PAR6, ma prende contatto con LGL in sede citoplasmatica (Bilder and Perrimon, 2000; Plant et al., 2003; Yamanaka et al., 2003) (Fig. 1.11)

Il reclutamento delle Nectine e la successiva formazione delle giunzioni aderenti porta all'attivazione di CDC42, grazie al legame di un residuo di GTP alla proteina (Fukata and Kaibuchi, 2001; Kim et al., 2000; Nakagawa et al., 2001; Noren et al., 2001); CDC42-GTP ora può interagire con PAR6 e attivare aPKC (Lin et al., 2000; Noda et al., 2001; Qiu et al., 2000). Grazie all'attività chinastica, aPKC fosforila LGL1, permettendone la sua dissociazione dal complesso GTP-CDC42/PAR6/aPKC e successiva distribuzione a livello della membrana baso-laterale, dove può interagire con DLG e SCRIB per formare il complesso baso-laterale di Scribble (Plant et al., 2003). La proteina aPKC successivamente interagisce e fosforila PAR3, consentendo la formazione del complesso attivo PAR3/PAR6/aPKC (Hutterer et al., 2004) (Fig. 1.11). Quest'ultimo si localizza ai siti di formazione delle giunzioni occludenti, prende contatto con i membri del complesso di Crumbs ed, insieme, coordinano la formazione e mantenimento delle giunzioni occludenti (Plant et al., 2003; Yamanaka et al., 2003) (Fig. 1.11).

La stessa proteina Crumbs è soggetta all'attività chinastica di aPKC: la sua fosforilazione aPKC-dipendente è un prerequisito importante per la corretta attività di tale proteina nel controllo della polarità apico-basale (Sotillos et al., 2004).

Da quanto descritto, si può affermare che CDC42 rivesta un ruolo centrale nell'intero processo; il complesso PAR-aPKC ha il ruolo di amplificare i segnali CDC42-mediati e li collega a tutti i differenti elementi coinvolti nella polarità cellulare (Suzuki and Ohno, 2006). Le giunzioni di adesione cellulare fungono da riferimento per l'orientamento dell'asse di polarità (Nelson, 2003). L'attivazione e la stabilizzazione del dimero PAR6-aPKC da parte di CDC42 è di fondamentale importanza per il positivo mantenimento dei segnali di polarizzazione. E' proprio il complesso binario attivato PAR6-aPKC, infatti, che trasloca dal citoplasma verso la membrana apicale e regola la localizzazione mutualmente esclusiva dei complessi di Crumbs e Scribble tramite fosforilazione, mantenendo così l'integrità del dominio apicale (Goldstein and Macara, 2007).

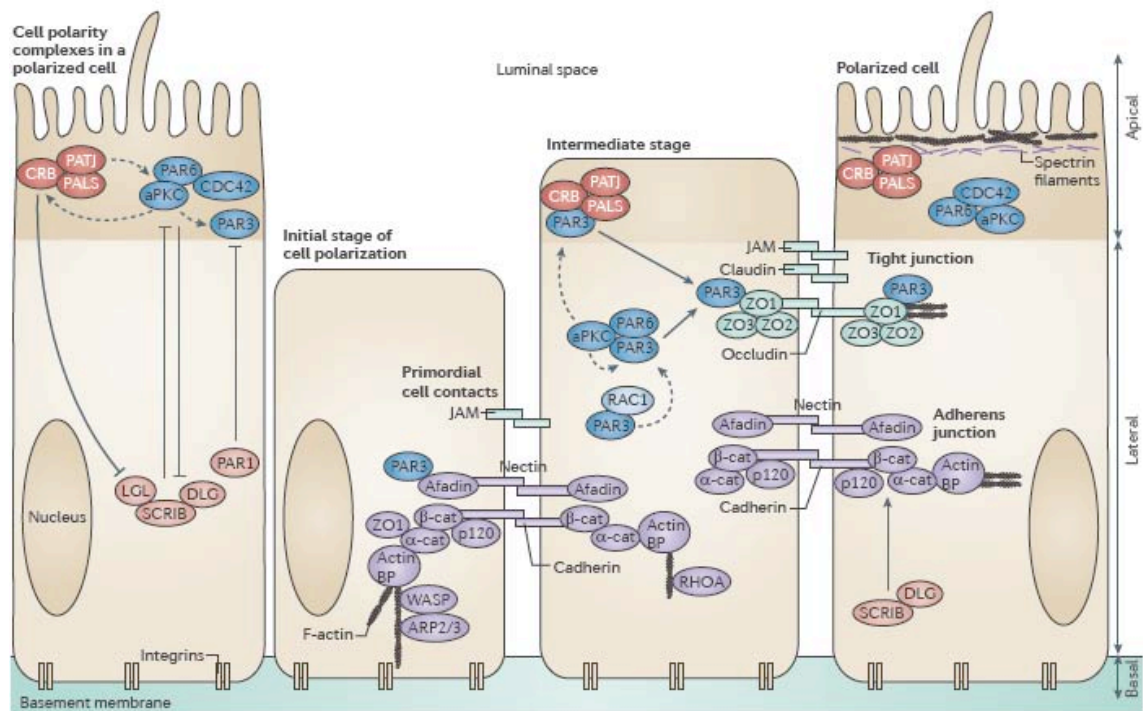


Figura 1.11 Meccanismi di formazione delle giunzioni aderenti e giunzioni occludenti e processo di attivazione funzionali tra i complessi di polarità. Le proteine transmembrana appartenenti alla famiglia delle Nectine si localizzano nella regione baso-laterale della cellula epiteliale e regolano la formazione di giunzioni aderenti. Questo processo attiva il reclutamento delle proteine JAM, componenti delle giunzioni occludenti *tight junction*. I tre complessi tramite interazioni antagonistiche regolano spaziotemporalmente la polarizzazione di cellule epiteliali, grazie alle loro interazione con le molecole di adesione. A stadi precoci PAR3 lega Afadina e si localizza nella porzione apico-laterale della membrana. A stadi intermedi aPKC causa l'esclusione di PAR3 dalle giunzioni aderenti. A termine del processo i complessi di CRB e PAR si dispongono all'estremità apicale della cellula, costringendo il complesso di Scrib nella porzione basale. Tratto da (Martin-Belmonte and Perez-Moreno, 2012).

## **BOX Il pathway di WNT e la polarità cellulare**

Il segnale di WNT svolge un ruolo cruciale in molteplici aspetti delle fasi precoci di sviluppo embrionale regolando in particolar modo il differenziamento, la polarità, la migrazione e il destino cellulare. Controlla pertanto lo sviluppo embrionale di molti organi e tessuti tra cui il SNC in diversi organismi animali (ad es. in *Drosophila Melanogaster*, *Xenopus Laevis*, *Caenorhabditis Elegans*, *Mus Musculus*, *Homo Sapiens*). Le proteine WNT condividono un'omologia di sequenza che va dal 27% all'83% e sono altamente conservate tra specie diverse, dalla *Drosophila*, al topo, all'uomo (mentre sono assenti nelle piante, negli eucarioti unicellulari e nei procarioti) (Miller, 2002)

Nel sistema nervoso il segnale di WNT regola finemente tutti i processi che portano alla formazione del neurone maturo: dall'espansione cellulare dei progenitori neurali alla decisione del *lineage* neuronale da seguire, dalla crescita assonale, la morfogenesi dendritica, la migrazione fino alla formazione delle sinapsi.

In particolare, di seguito vedremo in che modo il segnale di WNT è in grado di interconnettere i processi che regolano alcuni meccanismi coinvolti nella generazione della polarità apico-basale; nella regolazione dello *spindle orientation* per permettere di avere divisioni simmetriche proliferative o asimmetriche differenziative; stimolando in questo modo la fase iniziale di espansione del *pool* di progenitori neurali neuroepiteliali.

### **La via del segnale di WNT**

Le proteine WNT agiscono legandosi ai recettori Frizzled (Fzd) (Pandur and Kuhl, 2001), i quali presentano un dominio extracellulare N-terminale ricco di cisteine che lega la proteina WNT, sette eliche transmembrana e una corta coda citoplasmatica carbossiterminale. Per l'attivazione del sistema è necessaria anche la presenza dei corecettori LDLrelated protein (LRP) e la formazione del complesso ternario (WNT/Fzd/LRP) (Miller, 2002). Il segnale canonico di WNT è trasdotto attraverso la via di segnalazione intracellulare che agisce regolando i livelli intracellulari di  $\beta$ -catenina.

$\beta$ -catenina è coinvolta nelle giunzioni aderenti delle cellule epiteliali: la sua funzione è fare da ponte tra il citoscheletro e le molecole di E-caderina, che mediano l'adesione omotipica tra le cellule. Il dominio citoplasmatico dell'E-caderina lega la  $\beta$ -catenina o la  $\gamma$ -catenina e queste a loro volta legano l' $\alpha$ -catenina, associata ai filamenti di actina

citoscheletrica. In assenza di segnalazione da WNT,  $\beta$ -catenina è degradata rapidamente dal complesso multiproteico APC/Axina/GSK-3 $\beta$  (Glicogeno Sintasi Chinasi-3 $\beta$ ). In tale complesso APC e Axina facilitano la fosforilazione di  $\beta$ -catenina da parte di GSK-3 $\beta$  e ne sono esse stesse substrato, venendo fosforilate e aumentando così la quantità di  $\beta$ -catenina legata. Una volta fosforilata,  $\beta$ -catenina viene poliubiquitinata e quindi degradata dal proteasoma (Fig. 1.12) (Nelson and Nusse, 2004). In presenza delle proteine WNT, i recettori Fzd e LRP vengono attivati e causano due eventi distinti. Innanzitutto l'Axina si lega al dominio citoplasmatico di LRP, viene sequestrata a livello della membrana plasmatica, dove viene inattivata e/o indirizzata alla degradazione (Cadigan and Liu, 2006). Viene inoltre indotta la fosforilazione di Dishevelled (Dvl), proteina dello *scaffold* citoplasmatico, che interagisce anch'essa con l'Axina e inattiva GSK-3 $\beta$ . Ciò determina un aumento di  $\beta$ -catenina citoplasmatica non fosforilata, la quale migra nel nucleo dove funge da trans-attivatore trascrizionale dei suoi geni bersaglio, complessandosi ai fattori di trascrizione TCF/LEF (Fig. 1.12). Alcuni sono geni importanti per la progressione del ciclo cellulare, come ad esempio C-MYC, Ciclina D1 e Gastrina, altri sono invece inibitori dell'apoptosi, come survivina, oppure geni promuoventi la progressione tumorale, come laminina- $\gamma$ 2, e mmp7 (*matrix metalloproteinase-7*), che codificano per proteine coinvolte nella degradazione della membrana basale e della matrice extracellulare (Miller, 2002; Stadel et al., 2006).



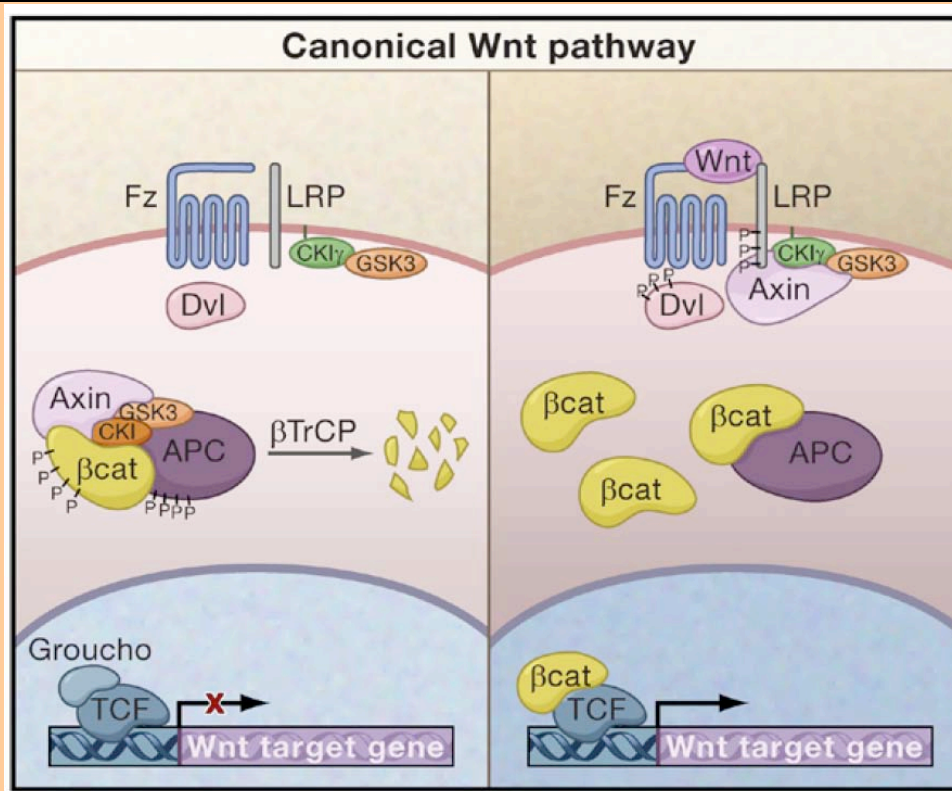


Figura 1.12 Rappresentazione schematica della via canonica del segnale di WNT. In assenza di ligandi, il complesso di degradazione della  $\beta$ -catenina è attivato. Questo porterà all'ubiquitinazione di  $\beta$ -catenina, mediata dalla sua fosforilazione da parte di GSK3, e alla sua degradazione al proteasoma. In presenza di del segnale di WNT, il complesso Axin-GSK3-CKI-APC non è in grado di assemblarsi, i livelli di  $\beta$ -catenina sono stabilizzati e può migrare verso il nucleo a livello dei promotori dei geni controllati da WNT. Tratto da (Clevers, 2006).

### WNT e il ruolo di GSK3 nel controllo del *self-renewal* e della polarità nella neurogenesi

Studi effettuati durante lo sviluppo embrionale della corteccia cerebrale hanno evidenziato che la via del segnale di WNT/  $\beta$ -catenina controlla la proliferazione dei progenitori neurali, regolando la loro uscita dal ciclo cellulare (Chenn and Walsh, 2002; Zechner et al., 2003). Infatti, una riduzione dei livelli dei ligandi di WNT o la rimozione della stessa  $\beta$ -catenina, provocano una diminuzione del *pool* di cellule neuroepiteliali e della glia radiale e di conseguenza un precoce differenziamento neuronale (Machon et al., 2003; Zechner et al., 2003). D'altra parte, una stimolazione della via provoca un'espansione del *pool* di cellule staminali neurali (Chenn and Walsh, 2002; Machon et al., 2003; Viti et al., 2003). Una spiegazione di questo meccanismo può risiedere nel fatto che il segnale di WNT può attivare direttamente l'espressione di alcuni geni quali

Cyclin D, Sox2 e Rest, tipicamente implicati nel mantenimento di cellule staminali neurali (Megason and McMahon, 2002; Nishihara et al., 2003; Takemoto et al., 2006). Proseguendo con lo sviluppo corticale WNT cambia completamente funzione e diventa un potente induttore del differenziamento neuronale, meccanismo in parte spiegato dall'attivazione del gene proneurale Neurogenina 1 (Hirabayashi et al., 2004; Israsena et al., 2004). Questa differenza di funzione nello sviluppo precoce e più tardivo è evidenziato dal lavoro di Chenn del 2002 che riporta come l'espressione di  $\beta$ -catenina a E10 promuove la proliferazione e il *self-renewal* dei progenitori neuroepiteliali, mentre a E14 stimola il differenziamento (Chenn and Walsh, 2002; Hirabayashi and Gotoh, 2005).

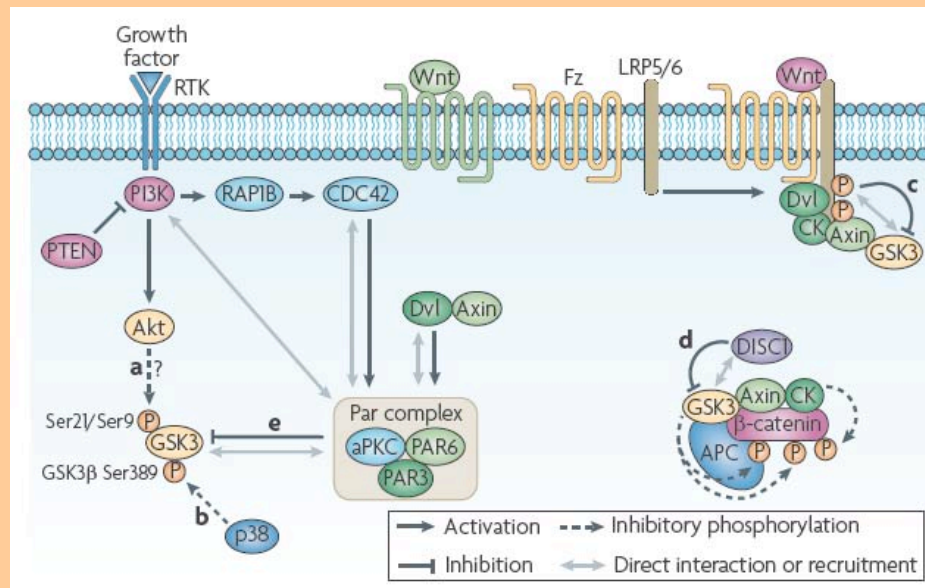
Perciò risulta chiaro dalla letteratura il ruolo regolatore di WNT durante le fasi precoci dello sviluppo neurale.

Inoltre è molto interessante osservare anche un legame tra GSK3, un elemento regolatore chiave del segnale di WNT, e i meccanismi che riguardano la polarità apico-basale. In un lavoro del 2003 infatti, Etienne-Manneville descrive, tramite saggio di co-immunoprecipitazione, che GSK3 interagisce direttamente con PAR6 e aPKC per promuovere, mediante la propria inattivazione, meccanismi di polarizzazione in astrociti di ratto (Etienne-Manneville and Hall, 2003). Inoltre CDC42 può fosforilare GSK3, modulandone l'attività.

Di grande rilevanza è ancora l'evidenza che la distribuzione polarizzata di tipiche proteine apicali e molecole di adesione, quali aPKC, caderine e APC, è alterata quando GSK3 viene deleta (Kim et al., 2009b). Ciò comporta una non asimmetrica distribuzione dei vari determinanti di polarità e di conseguenza si assiste ad un aumento delle divisioni simmetriche (Fig. 1.13B).

In conclusione, si evince che l'inattivazione di GSK3 promuove la proliferazione dei progenitori, in accordo con il fatto che quando la  $\beta$ -catenina è non fosforilata viene prevenuta la sua degradazione, e può andare ad agire sui geni bersaglio.

A



B

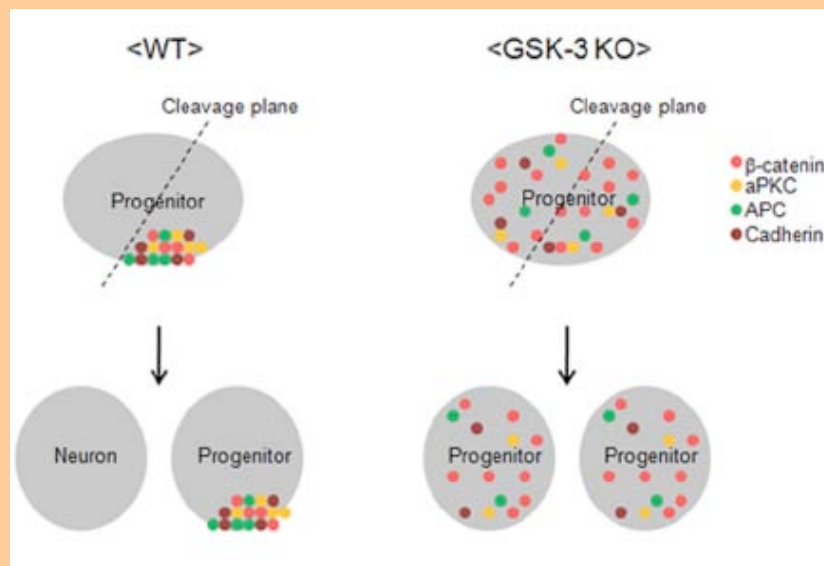


Figura 1.13 GSK3 come regolatore chiave nel controllo della neurogenesi e della polarità in progenitori neurali. (A) Meccanismi di inattivazione di GSK3. L'attività di GSK3 può essere inattivata tramite fosforilazione da parte di molteplici vie di segnale: nel *pathway* canonico di WNT, l'azione del ligando sul recettore recluta il complesso di degradazione di  $\beta$ -catenina in membrana portando alla fosforilazione e inattivazione di GSK3. Inoltre GSK3 interagisce direttamente anche con il complesso di PAR, causandone l'inattivazione. (B) Quando GSK3 è espresso normalmente nei progenitori neurali si ha una corretta localizzazione di determinanti di polarità che portano alla generazione di un progenitore e un neurone in seguito a divisione asimmetrica. In condizioni sperimentali di deplezione di GSK3, le molecole di polarità sono distribuite in maniera omogenea e qualsiasi piano mitotico porterà ad una divisione simmetrica proliferativa. Tratto da (Hur and Zhou, 2010) e (Kim and Snider, 2011).

## 1.6 Livelli delle proteine di polarità e destino dei progenitori neurali e del sistema nervoso

Abbiamo già descritto come la formazione del tubo neurale sia dipendente dalla capacità della cellula di assumere una conformazione ed una struttura polarizzata. L'insieme dei progenitori polarizzati, che formano il neuroepitelio pseudostratificato, è fondamentale per determinare il numero di neuroni maturi e la dimensione del cervello stesso (Fish et al., 2008).

Il numero finale di cellule nervose è regolato dal numero e dalla modalità con cui avvengono le divisioni nei progenitori neurali. Come già descritto nella prima parte dell'introduzione, divisioni di tipo simmetrico proliferative hanno come obiettivo quello di regolare e assicurare un *pool* di cellule staminali neurali, portando alla formazione di due cellule figlie identiche che ereditano in egual misura i determinanti del destino cellulare.

Le divisioni asimmetriche, invece, governano la formazione e regolazione di una popolazione di cellule differenziate.

Le cellule neuroepiteliali sono cellule con una spiccata polarità e le loro divisioni avvengono prevalentemente nella regione più apicale della regione ventricolare, dove sono localizzate numerose proteine di polarità (Fig. 1.14).

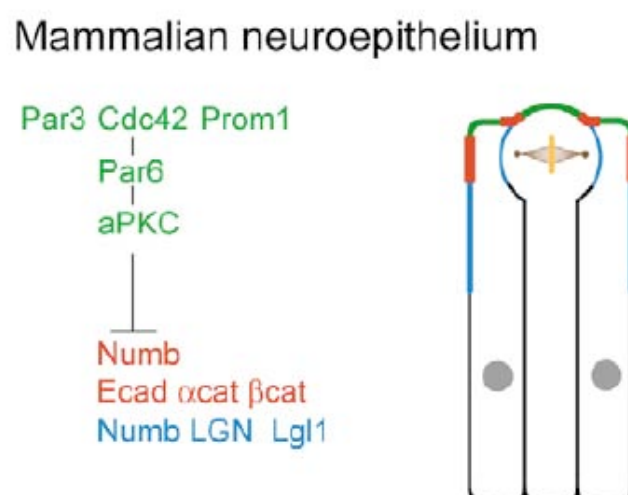


Figura 1.14 Polarità cellulare nelle cellule staminali neurali. Diversa localizzazione delle proteine apicali (verde), delle proteine delle giunzioni aderenti (rosso) e delle proteine baso-laterali (blu) in cellule neuroepiteliali di mammifero. Tratto da (Doe, 2008).

Sulla base di queste premesse, numerosi lavori si sono concentrati sulle proteine di polarità dimostrando che una riduzione dei livelli di tali proteine (es. CDC42; PAR3; PAR6) nelle cellule neuroepiteliali, porta ad una riduzione del numero progenitori neurali e ad un precoce differenziamento neurale. Una loro sovra-espressione, invece, stimola i processi proliferativi e riduce il differenziamento terminale (Fig. 1.15) (Cappello et al., 2006; Costa et al., 2008; Lee et al., 2006; Kim et al., 2010b; Boroviak and Rashbass, 2011).

Altri studi hanno dimostrato che proteine quali CDC42 e aPKC, grazie alla loro attivazione, controllano l'orientamento del fuso mitotico e conseguentemente il destino della cellula verso una divisione di tipo simmetrica o asimmetrica (Yu et al., 2006).

Nel prossimo paragrafo vogliamo descrivere i numerosi studi che hanno tracciato un ruolo fondamentale dei determinanti di polarità nella regolazione e determinazione del destino neurale, riportando evidenze analoghe sia *in vitro* sia *in vivo*.

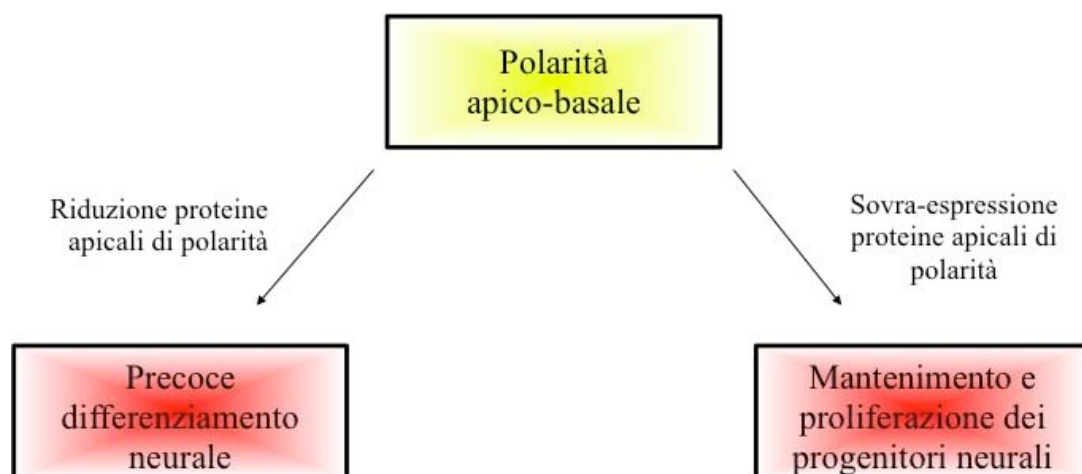


Figura 1.15 Schema generale che mette in relazione i livelli delle proteine di polarità apicale con il destino dei progenitori neurali. Alti livelli di determinanti polari promuovono il *self-renewal*, mentre bassi livelli stimolano l'uscita dal ciclo e il differenziamento neuronale.

### **1.6.1 Modulazione del complesso di Crumbs**

Un recente studio ha identificato il ruolo del determinante apicale di polarità CRB2, proteina transmembrana appartenente a uno dei due complessi apicali di polarità, nella regolazione della conversione neurale, grazie ad esperimenti di differenziamento di cellule staminali embrionali (ES) murine.

Si è osservato che una sovra-espressione di CRB2 permette la proliferazione cellulare e riduce il differenziamento terminale in condizioni neurogeniche oltre che a stabilizzare i livelli delle altre proteine di polarità.

Diversamente, il silenziamento dell'espressione di questa proteina causa morte cellulare nei primi giorni di differenziamento neurale, e nella cellula impedisce una corretta stabilizzazione dei differenti determinanti apicali di polarità.

Tuttavia, queste cellule sono comunque in grado di proliferare in condizioni di *self-renewal* e differenziare nella linea mesodermica ed endodermica (Boroviak and Rashbass, 2011).

Nel caso di un'altra proteina, PALS1, la sua assenza causa difetti non solo nel definire il destino cellulare, ma sorprendentemente anche nella sopravvivenza della stessa cellula. L'assenza di PALS1 determina una diminuzione dei progenitori neurali, a causa di una loro precoce uscita del ciclo cellulare, con conseguente incremento della popolazione di neuroni post-mitotici. Si osserva, inoltre, una rapida e considerevole morte cellulare, responsabile della successiva perdita della corretta struttura corticale (Kim et al., 2010b).

### **1.6.2 Modulazione del complesso di PAR e CDC42**

*In vivo* le cellule neuroepiteliali mostrano una polarità apico-basale; nei primi stadi di neurogenesi corticale, quando le condizioni di proliferazione cellulare sono elevate, le proteine di polarità PAR3, PAR6, aPKC e CDC42 sono localizzate apicalmente negli strati più interni della corteccia.

In queste regioni, parallelamente alla perdita del potenziale di proliferazione cellulare durante gli stadi successivi di neurogenesi, si assiste ad una progressiva diminuzione dei livelli di tali proteine.

Sulla base di tali evidenze, studi *in vivo* hanno dimostrato che, alterando i livelli di PAR3 o PAR6 e del loro regolatore CDC42, le proteine apicali dei complessi di polarità sono essenziali per la proliferazione ed il mantenimento dei progenitori neurali, oltre che per il controllo del destino di tali cellule.

Nel 2007, Costa e colleghi hanno studiato l'effetto di una riduzione delle proteine del complesso di PAR nei progenitori neurali dimostrando che una riduzione di PAR3 porta ad una prematura uscita di queste cellule dal ciclo cellulare e ad un precoce differenziamento in neuroni. Diversamente, la sovra-espressione di PAR3 (o PAR6) aumenta la proliferazione ed il mantenimento dei progenitori neurali (Costa et al., 2008).

Questo studio rivela un ruolo chiave delle proteine apicali del complesso di PAR nel promuovere la proliferazione dei progenitori neurali, suggerendo un possibile coinvolgimento di tali proteine nella regolazione dell'espressione di alcuni determinanti trascrizionali fondamentali per il destino cellulare.

Nel 2006, Cappello e collaboratori hanno studiato le conseguenze della delezione di CDC42 durante i differenti stadi di neurogenesi. I risultati hanno evidenziato un ruolo chiave di questa proteina nel mantenimento della polarità apico-basale e nel *self-renewal* dei progenitori nella regione ventricolare. Sebbene la delezione di CDC42 non sembri influenzare l'orientamento del fuso mitotico e la regolazione del ciclo cellulare, si assiste ad una mancata localizzazione apicale del complesso di PAR e ad una progressiva perdita delle giunzioni aderenti. Queste evidenze suggeriscono che CDC42 è fondamentale per la regolazione del destino dei progenitori apicali, infatti una perdita di tale proteina porta ad una graduale conversione dei progenitori apicali della zona ventricolare in progenitori basali della zona sub-ventricolare (Cappello et al., 2006).

Wu e colleghi, nel 2007, hanno invece studiato il ruolo di CDC42 lavorando su cellule ES murine deplete del gene *CDC42*. Anche in questo caso le cellule mostrano difetti nella polarità cellulare, nelle giunzioni cellula-cellula e nella sopravvivenza cellulare. Questi difetti osservati corrispondono ad una diminuzione della fosforilazione e conseguente attivazione di aPKC, oltre che ad una sua mancata localizzazione nella regione apicale (Wu et al., 2007). I risultati di questi ultimi lavori hanno confermato quanto già precedentemente osservato da Chen e colleghi, i quali avevano analizzato le conseguenze dell'inattivazione del gene *CDC42 in vitro* ed *in vivo*. Cellule ES murine prive di CDC42 mostrano difetti nell'organizzazione del citoscheletro, mentre *in vivo*

l'assenza di tale proteina si rivela letale nei precoci stadi di sviluppo embrionale (E7.5) (Chen et al., 2000).

### **1.6.3 Altre proteine coinvolte nella regolazione del destino neurale: USP9X e Staufen**

La proteina USP9X compare in scena nel 2009 per una sua funzione collegabile alla polarità cellulare. USP9X, un enzima deubiquitinilante che controlla il riciclo delle proteine cellulari, regola la polarizzazione e il *self-renewal* dei progenitori neurali derivanti da cellule ES. È stato infatti dimostrato che elevati livelli di questa proteina producono una drammatica alterazione dell'architettura cellulare con più dell'80% dei progenitori neurali collocati in strutture radiali altamente polarizzate.

Inoltre, pur in assenza di fattori di crescita esogeni, una sovra-espressione di USP9X è in grado di determinare un aumento del numero di progenitori radiali e di neuroni.

Jolly e collaboratori hanno quindi concluso che questa proteina stimola la proliferazione dei progenitori radiali, favorendo una condizione opportuna per il *self-renewal*, e non influisce sul loro successivo differenziamento a neuroni ed astrociti (Jolly et al., 2009).

I lavori descritti dimostrano che una riduzione delle proteine apicali di polarità induce un precoce differenziamento neurale. Diversamente, una sovra-espressione di tali proteine favorisce il mantenimento e la proliferazione dei progenitori neurali.

Recentemente sono stati pubblicati altri due lavori che supportano le evidenze finora descritte: oggetto di questi studi è una proteina localizzata nella regione apicale dei precursori della glia radiale. È stato osservato che Staufen stimola la proliferazione e il mantenimento dei precursori neurali, rivelando un suo importante ruolo nel normale sviluppo corticale. Diversamente, la mancata espressione di tale proteina induce un prematuro differenziamento dei progenitori neurali in neuroni (Vessey et al., 2012; Kusek et al., 2012).



## **2. Htt e il suo ruolo nello sviluppo neurale**

### **2.1 La proteina htt: fisiologia della proteina sana nel cervello adulto**

L'htt è una proteina di 3144 amminoacidi codificata dal gene *Hdh*. Il gene *Hdh* mappa sul braccio corto del cromosoma 4, si estende per circa 180 kb ed è costituito da 67 esoni (1993).

La proteina umana è costituita da ed è caratterizzata da un tratto poliglutamminico (polyQ) nella porzione N-terminale, che nei soggetti sani contiene fino a 35 ripetizioni (1993).

Htt è completamente solubile, è espressa ubiquitariamente e per questo motivo, ad oggi, non è ancora stata identificata una funzione primaria e univoca.

Htt infatti è rilevabile in cellule cerebrali, nei testicoli e in minor misura anche nei polmoni, nel cuore, nei reni e nel fegato (Sharp et al., 1995; Wood et al., 1996). Nell'uomo e nel roditore i livelli più elevati di proteina si trovano comunque a livello dei neuroni del SNC, e in particolare nei neuroni piramidali corticali che proiettano allo striato (Fusco et al., 1999).

A livello cellulare l'htt ha una localizzazione citoplasmatica, associata alle membrane, al reticolo endoplasmatico e all'apparato di Golgi; è stata identificata nel corpo cellulare, nei dendriti, negli assoni, a livello del citoscheletro (Sharp et al., 1995) e a livello sinaptico associata a strutture vescicolari (Li et al., 2003). Ulteriori analisi hanno evidenziato una localizzazione dell'htt nello spazio intracellulare, anche a livello di specifici organelli e strutture cellulari. È stata riscontrata la presenza dell'htt legata alla membrana in modo simile alla sinaptofisina, una proteina integrale di membrana trovata nelle vescicole presinaptiche dei neuroni (Reddy et al., 1998). Inoltre l'identificazione della proteina in associazione con i microtubuli ha portato ad ipotizzare un ruolo dell'htt nel trasporto cellulare (Gutekunst et al., 1995).

Kegel e collaboratori hanno dimostrato la presenza di htt sana e mutata nel nucleo, a livello di subcompartimenti del nucleolo e in corpi nucleari che raggruppano proteine coinvolte nel processamento delle forme immature di RNA. La presenza inaspettata dell'htt nel nucleolo suggerisce che tale proteina possa essere coinvolta nel processamento degli RNA ribosomiali o perfino nella genesi dei ribosomi stessi (Kegel et al., 2002).

Recenti studi hanno indicato che la proteina, nella sua forma sana, svolge attività fondamentali nei neuroni cerebrali, suggerendo che la perdita di tali funzioni possa concorrere allo sviluppo dello stato patologico.

### **2.1.1 Htt e il suo ruolo antiapoptotico**

L'htt è una proteina localizzata in modo particolare nel citoplasma di neuroni della corteccia celebrale e dello striato e risulta essenziale per la sopravvivenza dei neuroni nell'adulto: studi *in vitro* ed *in vivo* hanno confermato, infatti, che tale proteina riveste un ruolo anti-apoptotico nei neuroni del sistema nervoso centrale.

E' stato descritto che l'overespressione di htt sana in cellule neuronali *in vitro* è in grado di proteggere da stimoli tossici (Rigamonti et al., 2000) e previene la morte cellulare indotta dalla proteina mutata (Ho et al., 2001). Al contrario, cellule deplete di htt sono più sensibili alla morte cellulare indotta da apoptosi e infatti mostrano livelli aumentati nell'attività della Caspasi-3 (Zhang et al., 2006).

Studi ulteriori hanno dimostrato che l'htt è in grado di ostacolare il processo apoptotico interagendo fisicamente con la caspasi-3 attivata, inattivandone l'azione proteolitica. Inoltre si aggiungono evidenze che l'htt inibisce anche la formazione del complesso pro-apoptotico HIPPI-HIP1, interferendo con l'attivazione della procaspasi-8 (Gervais et al., 2002; Hackam et al., 2000).

Studi *in vivo*, svolti su modelli animali condizionali in cui l'espressione dell'htt sana può essere spenta a tempi desiderati, hanno permesso una prima analisi del ruolo di tale proteina nei neuroni cerebrali dell'animale, confermando che la perdita della funzione dell'htt sana produce danni cerebrali (Zeitlin et al., 1995). L'inattivazione neuronale del gene dell'htt nel topo adulto, mediante il sistema Cre-LoxP, determina apoptosi cellulare nell'ippocampo, nella corteccia e nello striato (Dragatsis et al., 2000). Similmente, analisi morfometriche e ultrastrutturali di topi *knock-out* eterozigoti hanno rivelato la presenza di cellule apoptotiche nel cervello adulto (Nasir et al., 1995).

La deplezione dell'htt normale a diversi stadi di vita postnatale dell'animale, provoca morte neuronale di tipo apoptotico e disfunzioni neurologiche comportamentali.

L'htt sana esplica, quindi, un ruolo protettivo in quanto interrompe la normale cascata di eventi molecolari che portano alla morte cellulare di tipo apoptotico.

### 2.1.2 Htt e trascrizione genica del BDNF

Nonostante questi studi abbiano aperto interessanti prospettive sul ruolo benefico dell'htt sana, resta tuttora da spiegare il meccanismo attraverso il quale si sviluppa la degenerazione selettiva dei neuroni striatali tipica della malattia di Huntington (HD). Oltre alla fondamentale azione antiapoptotica, evidenze biologiche e molecolari hanno collegato l'htt sana al BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*), una neurotrofina particolarmente importante per sopravvivenza dei neuroni striatali e per l'attività delle sinapsi cortico-striatali (Zuccato and Cattaneo, 2007). Il BDNF viene prodotto nel corpo cellulare dei neuroni della corteccia e trasportato lungo gli assoni di connessione con lo striato, dove viene poi rilasciato (Altar et al., 1997; Baquet et al., 2004; Fusco et al., 1999). Inoltre è stato dimostrato che htt influenza positivamente la trascrizione del gene del BDNF e quindi la successiva produzione di neurotrofina; questa funzione viene persa quando htt è mutata. Ciò si traduce in una ridotta produzione di BDNF: il supporto neurotrofico ai neuroni striatali viene a mancare e i neuroni muoiono (Zuccato et al., 2001; Zuccato and Cattaneo, 2007). Numerose evidenze hanno portato alla conclusione che l'htt sana contribuisce al mantenimento dei corretti livelli di BDNF nella corteccia cerebrale. Una ridotta attività dell'htt sana invece, causa una diminuzione di produzione e trasporto di BDNF al *target* striatale, causando una selettiva degenerazione di questa sottopopolazione neuronale (Gauthier et al., 2004; Zuccato et al., 2003). Eleganti analisi di espressione genica hanno identificato il meccanismo molecolare grazie al quale l'htt sana regola la trascrizione del gene BDNF: l'htt sana lega direttamente il regolatore trascrizionale REST/NRSF e in questo modo regola l'attività del promotore del gene del BDNF (Zuccato et al., 2003). Specificamente l'elemento silenziatore RE1/NRSE, presente nelle sequenze regolatrici a monte del gene del BDNF, viene inibito in presenza di htt sana attraverso il sequestro citoplasmatico di REST, che in questo modo non può esercitare la sua attività nucleare sull'elemento NRSE (Fig. 1.16).

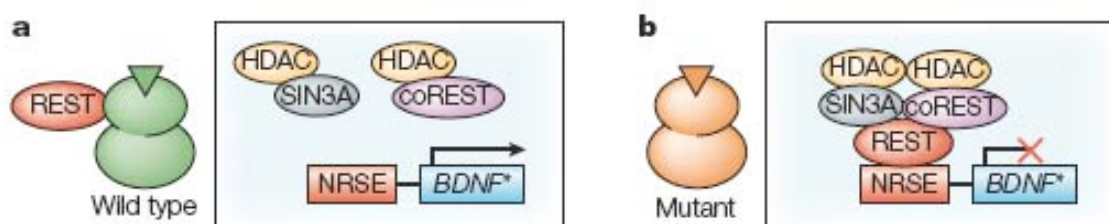


Figura 1.16 Meccanismo molecolare della funzione dell'htt sana. htt sequestra il repressore trascrizionale REST nel citoplasma, che in questo modo non può legarsi alla sequenza regolatoria NRSE, permettendo la trascrizione del BDNF.

### 2.1.3 Htt e attività sinaptica

Infine è importante sottolineare l'importante ruolo dell'htt sana anche a livello del trasporto assonale e nell'attività sinaptica, del *trafficking* mitocondriale e dello stesso trasporto vescicolare del BDNF (Velier et al., 1998; Gauthier et al., 2004).

L'htt è in grado di interagire sia con proteine delle vescicole sinaptiche che con proteine citoscheletriche essenziali per i fenomeni di eso- ed endocitosi tipici dei terminali sinaptici, suggerendo un ruolo dell'htt nel controllo dell'attività sinaptica (Smith et al., 2005). È stato dimostrato che l'htt è in grado di legarsi in modo diretto a PSD95 (*Postsynaptic Density Protein 95*), una molecola chiave nella trasmissione sinaptica (Sun et al., 2001). Infatti, PSD95, membro della famiglia delle guanilato chinasi membrana-associate (MAGUK), svolge un ruolo cruciale nella formazione e mantenimento del sistema recettoriale a livello post-sinaptico (Keith and El-Husseini, 2008). L'htt sana interagendo a livello citoplasmatico con PSD95 ne regola la presenza a livello post-sinaptico influenzando così l'ancoraggio dei recettori AMPA ed NMDA alla membrana post-sinaptica. La presenza della mutazione riduce la capacità dell'htt di legare PSD95 con conseguente aumento della proteina a livello post-sinaptico dove promuove la fosforilazione della subunità N2B del recettore NMDA. La fosforilazione della subunità N2B aumenta la sensibilità del recettore NMDA al glutammato, portando ad un aumento dell'effetto eccitotossico sulla cellula post-sinaptica (Sun et al., 2001; Song et al., 2003).

L'htt può anche essere parte del complesso pre-sinaptico attraverso l'interazione con HIP1 (Parker et al., 2007). Inoltre, è in grado di interagire con ulteriori proteine coinvolte nella trasmissione sinaptica quali la protein chinasi C, la syntaxina ed endofillina A. Ulteriori studi hanno evidenziato anche la capacità della proteina di regolare il traffico dei mitocondri: in neuroni embrionali striatali prelevati da topi esprimanti il 50% dei livelli di htt sana, si è osservata una progressiva riduzione della mobilitazione dei mitocondri (Trushina et al., 2004). E' stato ipotizzato che la capacità dell'htt di regolare

il trasporto assonale derivi dalla sua partecipazione alla formazione di complessi motori sui microtubuli.

## 2.2 Htt e conversione neurale

Le evidenze sperimentali ed i dati descritti nel paragrafo precedente mostrano come l'htt ricopra sana ricopra molteplici funzioni e differenti ruoli protettivi per i neuroni del cervello adulto, svolgendo un'importante azione benefica.

E però molto interessante osservare come, sebbene l'HD non sia ancora stata descritta come una patologia dello sviluppo, l'htt svolga una funzione critica fin dalle fasi precoci dello sviluppo embrionale, ed in particolare del sistema nervoso.

In un primo studio del 1995, sono stati generati modelli murini *knock-out* omozigoti per l'htt ( $Hdh^{-/-}$ ), i quali, mostrando profondi difetti morfologici nella fase di gastrulazione, non sono in grado di superare l'ottavo giorno di vita embrionale (Duyao et al., 1995; Nasir et al., 1995; Zeitlin et al., 1995). La morte sembra sia correlata a difetti nell'organizzazione dei tessuti extra-embrionali. L'eccessiva presenza di cellule apoptotiche nell'ectoderma di embrioni  $Hdh^{-/-}$ , ha fatto avanzare l'ipotesi che l'htt fosse coinvolta in processi antiapoptotici durante lo sviluppo.

Nel 1997, White e collaboratori hanno condotto uno studio su modelli murini in cui uno dei due alleli è stato sostituito con la porzione contenente l'esone 1 del gene mutato dell'htt umana (Q50), e l'altro è stato deletato del gene codificante per l'htt. L'esone 1 è la regione del gene in cui è presente la ripetizione della tripletta CAG (polyQ), codificante per l'amminoacido glutammina (Q). Gli animali che esprimono ridotti livelli di htt mutata ( $Hdh^{neoQ50}$ ) mostrano alterazioni nello sviluppo del cervello e morte prematura (E7.5), evidenziando il ruolo importante della proteina nella neurogenesi. Infatti, topi esprimenti livelli normali di proteina mutata ( $Hdh^{Q50}$ ) non presentano questo tipo di alterazioni, confermando come anche la proteina mutata consenta il corretto sviluppo embrionale (White et al., 1997); sulla base di tali evidenze, numerosi studi hanno indagato il ruolo dell'htt durante lo sviluppo del SNC. Riducendo più del 50% i livelli di htt negli animali in esame, è stato possibile osservare la comparsa di difetti a livello della formazione dell'epiblasto, da cui ha origine il tubo neurale; queste alterazioni provocano anomalie a livello striatale e corticale nell'embrione (Auerbach et al., 2001).

Nel 2009 Henshall e collaboratori hanno dimostrato che, riducendo i livelli di espressione di htt durante lo sviluppo embrionale dello *Zebrafish*, si verificano difetti nella formazione della parte anteriore della piastra neurale (Henshall et al., 2009).

Esperimenti condotti su chimere murine, create iniettando cellule ES prive di htt ( $ES\ Hdh^{-/-}$ ) in blastocisti sane, hanno evidenziato che l'htt è necessaria per il

differenziamento di neuroni striatali e corticali e per il mantenimento della loro identità (Reiner et al., 2001). Infatti, questi topi nascono, raggiungono la vita adulta ma presentano pochi neuroni  $Hdh^{-/-}$  in corteccia e striato (Reiner et al., 2001). Pertanto, è ipotizzabile che l'htt giochi un ruolo importante per la migrazione delle cellule verso queste aree cerebrali e/o per la proliferazione e la sopravvivenza cellulare (Reiner et al., 2001). Questi risultati sono stati confermati dal gruppo di Scott Zeitlin dell'Università della Virginia mediante l'inattivazione condizionale del gene dell'htt nel topo. La perdita di htt, sia subito dopo la nascita, che più tardivamente nello sviluppo del topo, causa degenerazione dei neuroni corticali e striatali nel cervello (Dragatsis et al., 2000). Recentemente Godin e colleghi hanno analizzato la localizzazione cellulare dell'htt in cellule neuronali murine durante la mitosi, rilevando una sua elevata concentrazione a livello del fuso mitotico, prevalentemente nel corso della metafase. Gli stessi, tramite elettroporazione *in utero* di RNA interferente per l'htt, hanno ridotto la sua espressione nei progenitori neurali di embrioni murini; allo stadio embrionale E14.5, si è osservato un prematuro differenziamento dei progenitori corticali e tale fenomeno si ritiene sia causato, nei progenitori in divisione, da un alterato orientamento del fuso mitotico, di cui l'htt è quindi un importante regolatore. Gli autori hanno anche dimostrato che tutto ciò determina la divisione asimmetrica delle cellule e quindi il loro prematuro differenziamento. Questi dati mostrano che l'htt è coinvolta nella neurogenesi: alterando l'orientamento del fuso mitotico, diminuisce il *pool* dei progenitori neurali e, conseguentemente, viene promosso un prematuro differenziamento neurale delle cellule figlie (Godin et al., 2010).

Questo risultato, riportato in Fig. 1.17 è estremamente interessante perché, seppur gli autori non lo sottolineino nel loro articolo, ci permette di associare il comportamento dell'htt a quello delle proteine di polarità descritte nel capitolo precedente.

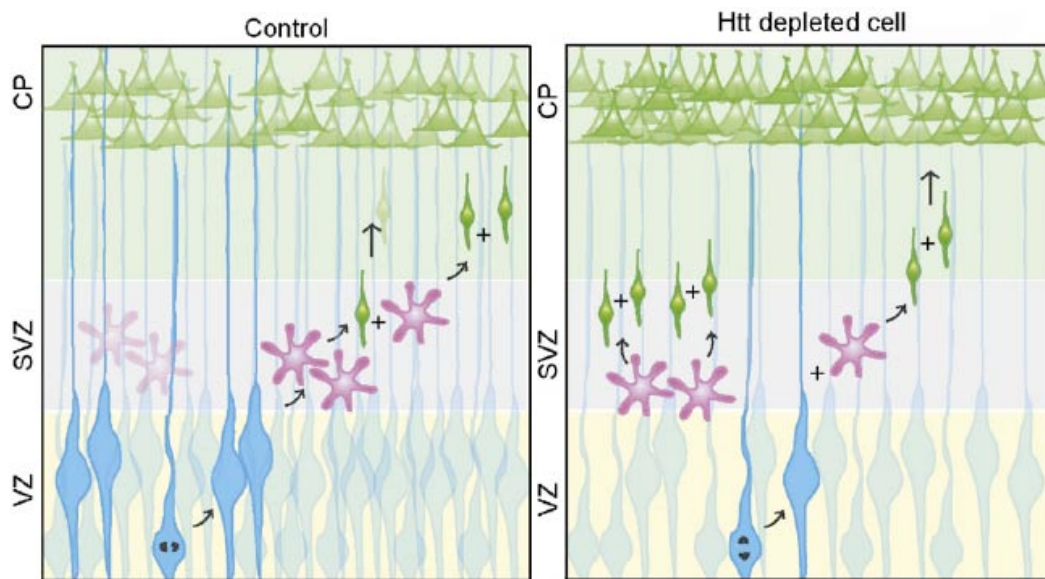


Figura 1.17 La perdita di htt nei progenitori corticali favorisce il differenziamento neuronale. Durante lo sviluppo corticale i progenitori localizzati nella zona ventricolare (VZ) vanno incontro ad una serie di divisioni che terminano con la generazione di un neurone post-mitotico (in verde), che migrerà radialmente per raggiungere gli strati superiori. I progenitori apicali (in blu), tramite una divisione asimmetrica possono generare un altro progenitore apicale ed un progenitore basale (in viola), che perde contatto con la superficie ventricolare. Nelle cellule controllo, la maggior parte delle divisioni dei progenitori apicali sono verticali, promuovendo il *self-renewal*. Rimuovendo l'htt, invece, i piani di divisione vengono modificati (orizzontali), causando una diminuzione del *pool* dei progenitori ciclianti e stimolando il differenziamento neuronale. Tratto da (Godin and Humbert, 2011).

Successivamente Tong e collaboratori, nel 2011, hanno silenziato l'espressione dell'htt in cellule neuroepiteliali, rilevando profondi disturbi nella migrazione neurale, ridotta proliferazione e aumentata morte cellulare durante lo sviluppo neurale. Monitorando topi in cui è stata ridotta l'espressione dell'htt, hanno dimostrato il ruolo essenziale della proteina nello sviluppo di neuroni di specifiche aree del cervello quali corteccia e striato, maggiormente compromesse nell'HD. Hanno dimostrato, inoltre, che esiste una ristretta finestra temporale nella quale la presenza dell'htt svolge un ruolo critico per lo sviluppo corticale. Gli effetti negativi dovuti all'assenza di htt sono maggiormente rilevabili ad uno stadio di sviluppo precoce (E12.5) e si attenuano negli stadi successivi, rivelando un periodo critico nel quale questa proteina è necessaria per lo sviluppo dei neuroni corticali (Tong et al., 2011).

Nel 2012, in un lavoro svolto nel nostro laboratorio (Lo Sardo et al., 2012) è stato descritto come l'htt regola la conversione neurale di cellule ES sottoposte ad un opportuno protocollo di differenziamento, tramite un meccanismo che coinvolge



processi di adesione dei progenitori neuroepiteliali durante la formazione del tubo neurale (Lo Sardo et al., 2012). L'htt, promuovendo l'adesione cellulare attraverso una modulazione negativa dell'attività della metallo-proteasi ADAM-10, svolge un ruolo fondamentale per la corretta formazione delle rosette neurali, strutture tridimensionali considerate il “paradigma” *in vitro* dello sviluppo del tubo neurale.

Per studiare il processo di neurulazione, sono state utilizzate cellule mES sottoposte ad uno specifico protocollo di differenziamento neurale che consente di generare strutture tridimensionali chiamate “rosette neuroepiteliali” (Ying et al., 2003). Normalmente le mES tra il giorno 5 e il giorno 7 del processo differenziativo vengono convertite in progenitori neuroepiteliali, i quali si dispongono radialmente attorno ad un lume centrale. Queste strutture chiamate rosette neuroepiteliali, ricapitolano *in vitro* ciò che succede *in vivo* al momento della chiusura della piastra neurale e della formazione del tubo neurale (Elkabetz et al., 2008; Abranches et al., 2009 e Sezione 2.3). Al contrario, studi su cellule murine deplete del gene per l'htt hanno mostrato una marcata ridotta capacità di formazione delle rosette, fenotipo definito da Lo Sardo e colleghi *rosetteless*. Parallelamente, sono stati condotti studi *in vivo* in embrioni di *Zebrafish*, in cui è stata bloccata l'espressione dell'htt durante lo sviluppo del tubo neurale. I dati ottenuti hanno confermato quanto osservato *in vitro*: la perdita di htt genera un'alterata distribuzione e aggregazione cellulare lungo il tubo neurale e induce difetti nella polarità apico-basale durante la neurogenesi, compromettendo così l'integrità del tubo neurale stesso (Lo Sardo et al., 2012). Grazie a tali evidenze si è compreso come l'htt rivesta un ruolo importante nella formazione del tubo neurale *in vivo* così come osservato *in vitro*: i difetti osservati nella formazione delle rosette neurali riproducono i difetti nella formazione del tubo neurale *in vivo* documentati nei precedenti lavori.

Anche in questo caso la compromessa conversione neurale, che sfocia nell'alterata citoarchitettura della rosetta neurale, ci ha lasciato ipotizzare una possibile alterazione nel *pathway* delle proteine di polarità. Inoltre anche i risultati mostrati da Boroviak e colleghi (Boroviak and Rashbass, 2011) di un'alterazione del processo di conversione neurale in mES in cui l'espressione di della proteina apicale CRB2 viene ridotta, sono in accordo con questa osservazione.

## 2.3 Protocollo di differenziamento neurale di cellule embrionali staminali murine

Nell'ultimo decennio sono stati sviluppati numerosi protocolli in grado di generare *in vitro* progenitori neurali, partendo da cellule ES pluripotenti.

L'obiettivo comune di questi lavori è stato quello di poter giungere alla generazione di rosette neurali, strutture tridimensionali considerate un valido modello di studio *in vitro* dello sviluppo del tubo neurale. Curchoe e colleghi hanno dimostrato che tali strutture esprimono numerose caratteristiche proprie del tubo neurale *in vivo* e la loro formazione segue meccanismi e stadi simili a quelli descritti nel sistema nervoso (Curchoe et al., 2012).

Le rosette neurali sono composte da cellule polarizzate (cellule primitive neuroepiteliali) che seguono una disposizione radiale e maturano organizzandosi intorno ad un lume centrale, formando una struttura che ricapitola il processo di formazione del tubo neurale *in vivo* (Fig. 1.18).

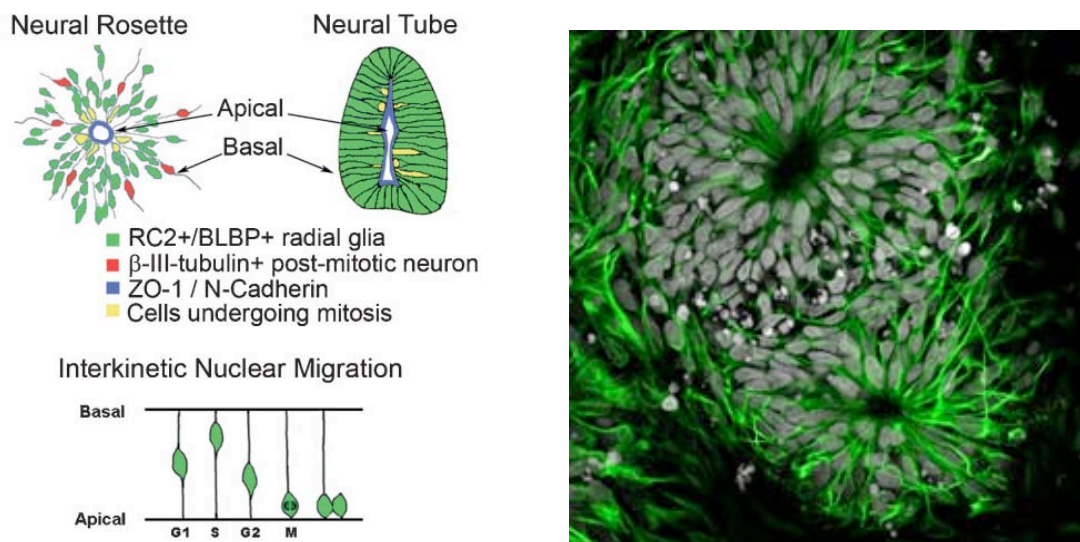


Figura 1.18 Le rosette neurali derivate da cellule ES hanno una morfologia che ricorda una sezione del tubo neurale. La polarità apico-basale è simile tra le rosette e il tubo neurale, con la presenza di tight junction (in blu ZO-1) alla superficie apicale del lume. I progenitori neurali sono organizzati in maniera radiale nella rosetta, così come nel tubo neurale (espressione di RC2 e BLBP). Inoltre si può osservare sia *in vivo* che *in vitro* il fenomeno della migrazione nucleare intercinetica (vedi paragrafo 1.2).

I progenitori neurali che costituiscono le rosette mostrano le stesse caratteristiche antigeniche delle cellule presenti nel tubo neurale durante lo sviluppo (Abranches et al., 2009).

Queste rosette rappresentano lo stadio precoce di cellule staminali neurali presenti *in vivo*, in grado di rispondere a differenti stimoli che regolano il differenziamento di tali cellule verso diversi destini neurali regione-specifici (Elkabetz et al., 2008).

Il processo di proliferazione nelle rosette sembra avvenire esclusivamente nella zona luminale, in cui avvengono divisioni simmetriche e in cui si assiste alla migrazione nucleare intercinetica, confermando la similarità con quanto avviene nel neuroepitelio pseudo-stratificato che compone il tubo neurale. Man mano che le cellule vanno incontro al processo di differenziamento neurale, si assiste alla formazione di neuroni post-mitotici nella regione basale delle rosette, derivanti da divisioni asimmetriche di progenitori neurali. Quanto descritto ripercorre numerosi eventi che avvengono durante lo sviluppo del cervello: le divisioni asimmetriche avvengono nella zona ventricolare ed i risultanti progenitori neurali migrano verso la superficie basale, dove danno origine a uno strato di neuroni maturi post-mitotici.

Sia nel tubo neurale che nelle rosette, in aggiunta a numerose somiglianze morfologiche, si osserva una asimmetrica disposizione di differenti proteine e giunzioni cellulari, grazie alla quale è possibile identificare una regione apicale distinta da una regione basale. Nestin, proteina dei filamenti intermedi, marca le cellule polarizzate della rosetta lungo il corpo cellulare, evidenziando una struttura tipicamente radiale. N-caderina, proteina delle giunzioni aderenti in cellule di tipo neurale, ha una caratteristica marcatura luminare. Sempre a livello del lume, ma in una posizione ancora più apicale, si può apprezzare la marcatura di ZO-1, proteina tipica delle giunzioni occludenti. Il rispetto della giusta localizzazione di tali giunzioni garantisce, nelle rosette così come nel tubo neurale, la definizione di una corretta polarità strutturale e funzionale. Il protocollo di conversione neurale che abbiamo scelto di utilizzare in questo lavoro di Tesi è stato quello descritto per la prima volta da Ying e collaboratori nel 2003. Le cellule ES vengono piastrate a bassa densità su una substrato di gelatina in un mezzo di coltura base privo di fattori che ne promuovono la pluripotenza.

Già dopo 5 giorni *in vitro* è possibile apprezzare la comparsa delle rosette neurali, in cui le cellule tendono ad assumere una morfologia bipolare, allungandosi e disponendosi radialmente attorno ad un lume centrale, in un modo che ricorda la formazione del tubo neurale *in vivo*.

Proprio grazie al protocollo rapido di conversione cellulare e alle similarità fenotipiche e funzionali delle rosette neurali con le cellule neuroepiteliali che compongono il tubo neurale, il differenziamento di cellule ES murine rappresenta un strumento valido per l'analisi di specifiche alterazioni dovute alla presenza o all'assenza di htt e proteine di polarità apico basale.

## **Parte 2**

### **Patologia dell'htt mutata in un modello malattia basato su cellule iPS**

### **3. Generazione di un modello cellulare di malattia, basato su cellule pluripotenti umane**

Dopo aver identificato un possibile nuovo ruolo dell'htt sana nello sviluppo neurale, nella seconda parte della Tesi vengono presentati i risultati ottenuti dalla generazione di un modello malattia grazie alla straordinaria scoperta della riprogrammazione somatica. Mostriamo come tramite questa tecnologia è possibile studiare *in vitro* l'effetto della proteina mutata in neuroni umani derivati da pazienti, al fine di analizzare i meccanismi patogenetici alla base dell'HD, validare fenotipi associati alla mutazione e cercare nuovi bersagli farmacologici.

#### **3.1 L'utilizzo di cellule pluripotenti umane come modello malattia**

Le cellule staminali pluripotenti umane, grazie alle loro caratteristiche di poter essere espanse all'infinito e di poter differenziare verso ogni sottotipo cellulare adulto, hanno rappresentato fin dalla loro scoperta, (i) uno strumento imprescindibile per studiare i meccanismi differenziativi che portano alla formazione di un tessuto adulto, (ii) una possibile risorsa per riparare i tessuti danneggiati da patologie o eventi traumatici, aprendo la strada a quella che oggi chiamiamo con speranza medicina rigenerativa. Queste due possibili applicazioni sono state rese immaginabili e possibili grazie alla prima linea di cellule embrionali staminali umane (hES), datata 1998 (Thomson et al., 1998).

Nel 2006 la straordinaria scoperta del Prof. Yamanaka della riprogrammazione somatica ha rivoluzionato e amplificato le potenzialità delle cellule pluripotenti umane (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPS), infatti, sono cellule somatiche adulte riprogrammate ad uno stadio di pluripotenza che posseggono caratteristiche paragonabili alle cellule embrionali staminali e pertanto possono differenziarsi in qualsiasi tipo di cellula di tessuti e di organi adulti. Essendo possibile generare linee di cellule pluripotenti indotte da qualsiasi cellula di qualsiasi individuo adulto, una terza applicazione è diventata altamente realizzabile: generare un modello malattia *in vitro* (Fig. 2.1).

La generazione di adeguati modelli cellulari umani delle patologie neurodegenerative è stata fino ad oggi difficile data l'inaccessibilità del tessuto nervoso, ed è stato

impossibile studiare direttamente i neuroni colpiti e scoprirne la causa della degenerazione, oltre che immaginare strategie terapeutiche mirate.

Fino a pochi anni fa le uniche risorse utilizzabili per creare modelli di malattie neurodegenerative umane *in vitro* erano rappresentate da cellule neuronali immortalizzate e dalle cellule embrionali staminali portatrici della malattia, identificate attraverso l'uso della diagnosi pre-impianto (PGD). La PGD permette di identificare prospetticamente embrioni portatori di geni malattia e, da quelli soprannumerari di derivare hES portatrici della mutazione, come descritto per la malattia di Huntington, la fibrosi cistica e la sindrome dell'X fragile (Mateizel et al., 2006; Pickering et al., 2005; Eiges et al., 2007). Nonostante questo tipo di approccio sia teoricamente possibile, nella pratica queste linee cellulari si rendono difficilmente disponibili per la pochissima disponibilità di embrioni derivati da PGD e per la casistica limitata di malattie identificabili tramite PGD.

Le cellule iPS possono essere sfruttate per identificare possibili bersagli molecolari correlati direttamente alla patologia e, sulla base di queste informazioni, per poter sviluppare nuovi approcci terapeutici e selezionare composti farmacologicamente attivi (Fig. 2.1)

Inoltre conservando l'esatto corredo genetico della cellula d'origine, le iPS possono essere utilizzate per generare un modello sperimentale della malattia paziente-specifico. In particolare nel caso dell'HD e delle altre patologie neurodegenerative, sarà possibile ottenere *in vitro* neuroni con lo stesso profilo genetico del paziente, dalle caratteristiche biologiche e biochimiche paragonabili a quelle dei neuroni colpiti.

La possibilità di generare cellule iPS direttamente dal paziente inoltre fornirebbe, in futuro, lo sviluppo di approcci cellulari sostitutivi usando cellule trapiantabili autologhe. In questa seconda parte di Tesi di dottorato abbiamo scelto proprio di sfruttare la potenzialità delle cellule pluripotenti indotte per creare un modello HD in laboratorio.

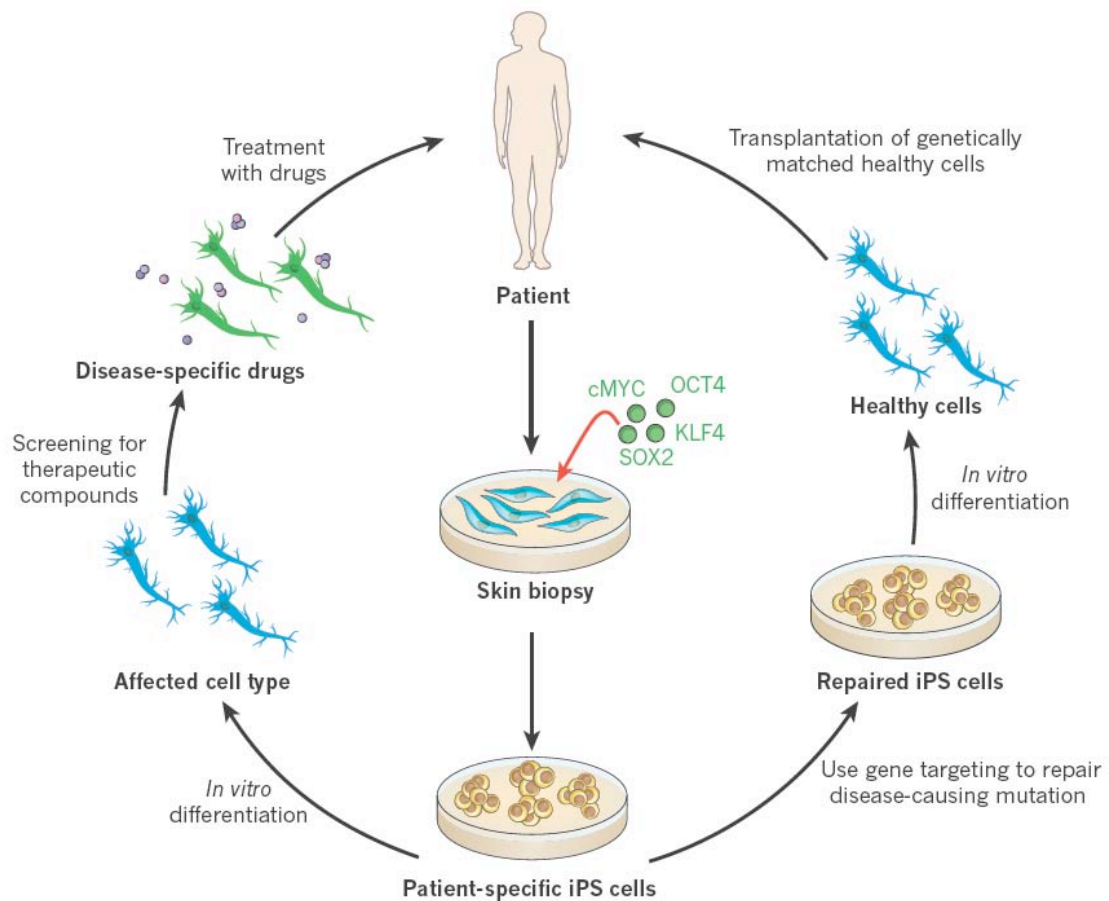


Figura 2.1 Possibili applicazioni di cellule iPS paziente specifiche. Grazie alla tecnica del reprogramming è possibile le iPS generate da paziente possono essere utilizzate per creare in vitro un modello della malattia, per studiare innovativi approcci terapeutici e identificare nuove molecole farmacologicamente attive. Inoltre in futuro sarà possibile precedere alla correzione genetica della mutazione e trapiantare le cellule autologhe corrette direttamente nel paziente. Tratto da (Robinton and Daley, 2012).

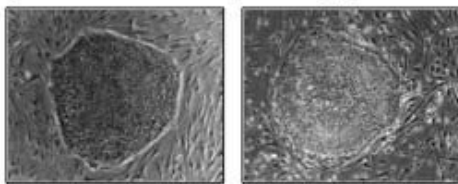


### 3.2 Cellule staminali pluripotenti indotte: caratteristiche e derivazione

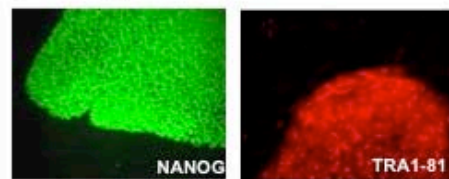
Il metodo per la generazione di cellule iPS è stato descritto per la prima volta da Yamanaka e colleghi nel 2006, quando è stato dimostrato come l'overespressione di quattro fattori di trascrizione tipicamente espressi da cellule embrionali staminali (OCT4, SOX2, C-MYC, e KLF4), fosse sufficiente per revertire cellule terminalmente differenziate ad uno stadio di pluripotenza (Takahashi and Yamanaka, 2006). Questa straordinaria scoperta ha fruttato a Yamanaka il premio Nobel per la Medicina nel 2012. Nello specifico fibroblasti embrionali prima murini e poi umani (Takahashi et al., 2007) sono stati infettati tramite vettori retrovirali per assicurare un'espressione forzata dei 4 fattori di riprogrammazione sopra citati, in grado di indurre un cambiamento epigenetico nella cellula, portandola alla riattivazione di geni associati alla pluripotenza e al *self-renewal*. Grazie a questo processo è possibile ottenere una linea di cellule pluripotenti che mantiene l'esatto corredo genetico della cellula adulta prelevata dal donatore con le potenzialità descritte nel paragrafo precedente per possibili applicazioni in medicina rigenerativa e personalizzata.

Le iPS condividono con le cellule ES caratteristiche morfologiche, l'attività della fosfatasi alcalina e i marcatori di pluripotenza nucleari OCT4 e NANOG e quelli di superficie SSEA-4, TRA 1-60, e TRA 1-81 (Dimos et al., 2008), oltre al profilo di metilazione di promotori genici. Inoltre come ogni linea di cellule pluripotenti possono dare origine a teratomi quando iniettate in animali immunodeficienti e contribuiscono alla formazione dei diversi tessuti dell'embrione dopo iniezione in blastocisti (Fig. 2.2). Per poter identificare i regolatori trascrizionali in grado di riprogrammare cellule adulte differenziate a cellule pluripotenti, il gruppo del Prof. Yamanaka ha effettuato uno *screening* tra 24 fattori associati alla pluripotenza per identificare quelli in grado di de-differenziare una cellula e riportarla allo stadio di cellula staminale pluripotente (Takahashi and Yamanaka, 2006). Come dimostrato nel loro lavoro, l'insieme dei 24 fattori, co-espressi tramite vettori retrovirali, ha portato alla formazione di colonie con una morfologia simile a quelle di cellule ES. Successive fasi di selezione di fattori hanno portato all'individuazione del set minimo di geni richiesto, composto appunto da KLF4, SOX2, C-MYC e OCT4 (Takahashi and Yamanaka, 2006).

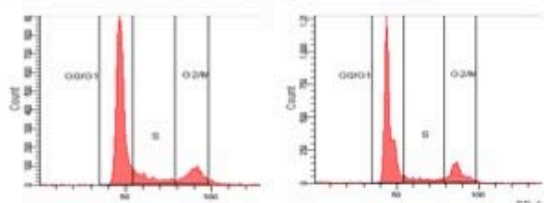
### 1) hES cell morphology



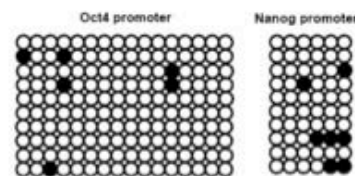
### 2) Pluripotency markers



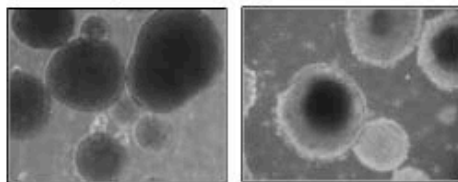
### 3) Cell cycle analysis



### 4) Promoter methylation



### 5) Embryoid body formation



### 6) Teratoma formation

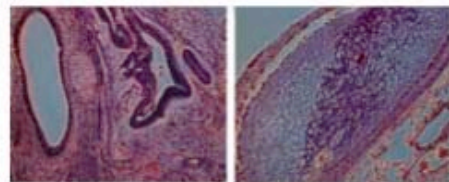


Figura 2.2 Criteri standard per la validazione di caratteristiche di pluripotenza.

Per poter utilizzare le cellule iPS come uno strumento di studio affidabile *in vitro* ed eventualmente pensare ad una loro possibile applicazione nella medicina traslazionale, è stato necessario mettere a punto delle tecniche di riprogrammazione sicure ed efficienti. A questo scopo negli ultimi anni sono stati proposti diversi sistemi per la generazione di cellule iPS.

I primi studi sulle cellule iPS prevedevano l'utilizzo di vettori integranti, e in particolare di natura retrovirale per l'inserzione dei geni di riprogrammazione (Takahashi and Yamanaka, 2006; Maherali and Hochedlinger, 2008; Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007).

Ad oggi questo rappresenta ancora il metodo più usato (circa il 75% delle pubblicazioni su iPS) (Bellin et al., 2012) e che garantisce la maggiore efficienza di riprogrammazione, sebbene la riattivazione dei transgeni virali talvolta possa interferire con il loro potenziale di sviluppo e possa comportare la formazione di tumori in animali chimerici (Okita et al., 2007). L'utilizzo di lentivirus invece permette di infettare sia le cellule ciclanti che quelle che non si stanno dividendo, anche se l'efficienza di riprogrammazione rimane assolutamente paragonabile a quella dei retrovirus (Brambrink et al., 2008; Sommer et al., 2010). Rimane comunque la problematica delle

integrazioni casuali nel genoma. L'utilizzo di vettori lentivirali inducibili, la cui espressione è controllata dalla somministrazione di doxiciolina, diminuisce il rischio di una continua espressione dei transgeni e permette la selezione di cloni di cellule iPS completamente riprogrammate (Brambrink et al., 2008; Stadtfeld et al., 2008).

I vettori lentivirali inoltre, possono essere ingegnerizzati in modo da esprimere cassette policistroniche contenenti i quattro fattori di riprogrammazione, minimizzando in questo modo il numero di integrazioni genomiche ed il correlato problema della diversa espressione dei singoli fattori (Carey et al., 2009; Sommer et al., 2009).

Uno passo successivo ha riguardato la messa a punto di metodiche che prevedessero l'uso di sistemi che evitassero il problema della riattivazione di transgeni e della mutagenesi inserzionale dovuta all'utilizzo di virus. Le tecniche per generare cellule iPS senza sistemi integranti sono divise in tre categorie: (i) quelle che prevedono vettori che non si integrano nel genoma della cellula ospite, (ii) quelle che usano vettori integranti che possono essere poi successivamente rimossi dal genoma, e (iii) quelle che non comprendono l'utilizzo di vettori basati su DNA (Fig. 2.3)

Le prime cellule iPS generate senza integrazione sono state derivate da epatociti di topo tramite l'uso di vettori adenovirali (Stadtfeld et al., 2008) e da fibroblasti embrionali murini tramite trasfezione con plasmidi (Okita et al., 2008). Anche fibroblasti umani sono stati riprogrammati tramite adenovirus (Zhou and Freed, 2009) o con vettori circolari episomali non integranti ed eliminabili tramite successive replicazioni (Yu et al., 2007). Quest'ultima metodica comporta però l'espressione contemporanea di sei fattori di trascrizione e un oncogene (OCT4, SOX2, C-MYC, KLF4, NANOG e LIN28).

Il problema maggiore associato all'utilizzo di queste metodiche è la ridotta efficienza di riprogrammazione, inferiore di diversi ordini di grandezza a quella raggiunta con l'utilizzo dei vettori integranti (0,001% vs 0,1-1%). Ciò è dovuto soprattutto al non mantenimento dell'espressione dei fattori per un tempo sufficiente per permettere il completo rimodellamento epigenetico necessario alla conversione da cellula terminalmente differenziata a cellula pluripotente.

Un'ulteriore strategia ha previsto l'impiego dei trasposoni PiggyBac, elementi genici mobili che possono essere introdotti e successivamente rimossi tramite l'espressione transiente della trasposasi (Woltjen et al., 2009; Yusa et al., 2009). La buona funzionalità del sistema ne permette la rimozione, ma rimane poi necessaria una

laboriosa caratterizzazione dei siti di integrazione nelle cellule iPS prima e dopo la rimozione.

Un ulteriore sviluppo delle metodiche di riprogrammazione non integranti si è direzionata verso l'utilizzo di proteine ricombinanti (Kim et al., 2009a). Sebbene il sistema sia sicuro e porti alla completa riprogrammazione, l'efficienza di successo è molto bassa e richiede l'aggiunta di ulteriori molecole che siano in grado di facilitare il rimodellamento epigenetico, quali inibitori dell'istone deacetilasi e l'acido valproico.

Un modo più efficiente e sicuro comporta invece l'utilizzo di molecole di RNA modificate, codificanti per i fattori di riprogrammazione (Warren et al., 2010). L'efficienza in termini di successo è paragonabile a quella dei vettori virali o addirittura superiore, ma va considerato il rischio di modifiche del DNA che potrebbero essere introdotte dall'utilizzo di molecole che agiscono direttamente sul materiale genetico.

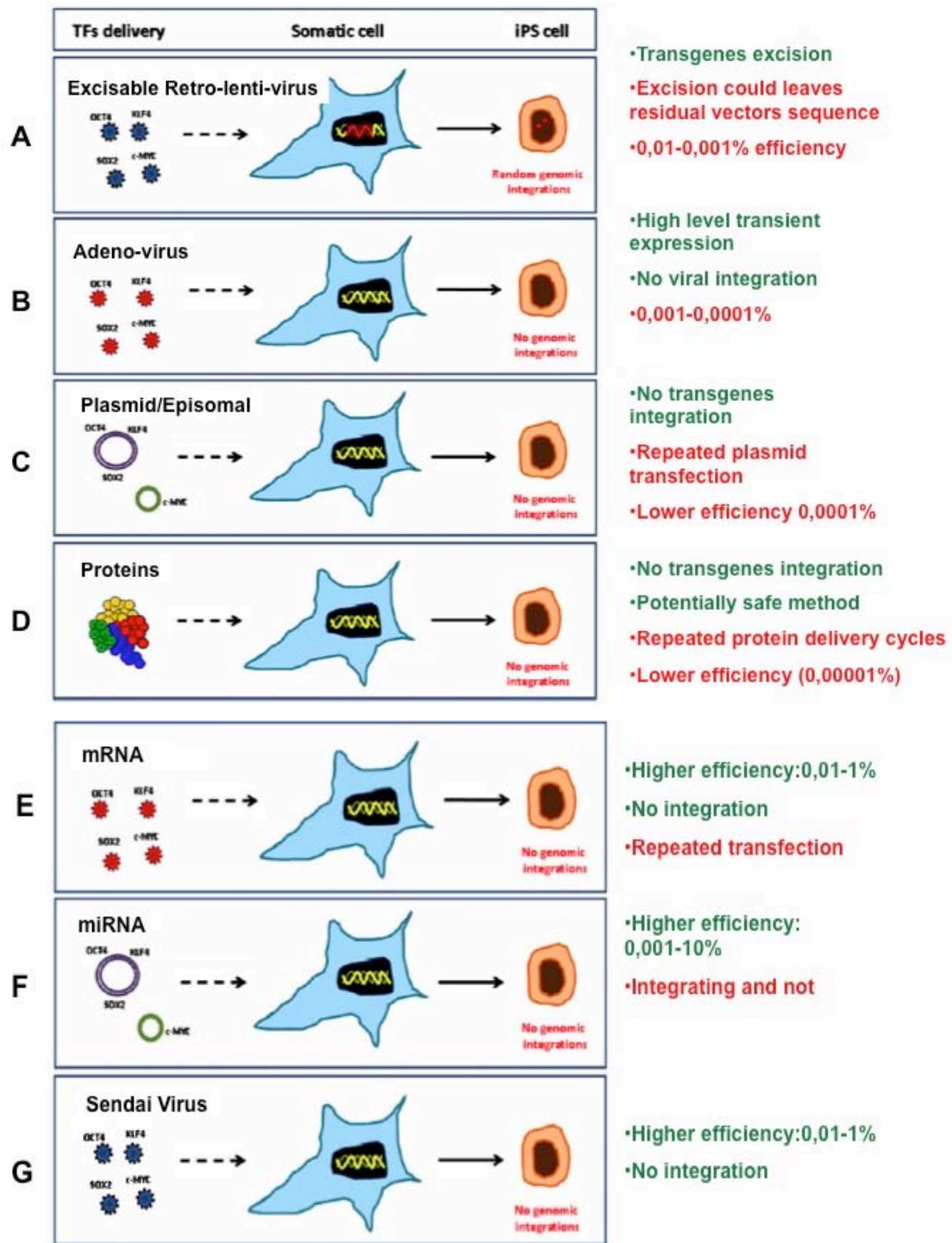


Figura 2.3 Metodi utilizzati per la riprogrammazione somatica.

### 3.3 Differenziamento neuronale di cellule pluripotenti umane

Negli ultimi anni sono stati messi a punto numerosi protocolli per differenziare cellule pluripotenti umane verso neuroni. Essendo interessati a studiare i meccanismi che portano alla morte selettiva di cellule neuronali, in questo lavoro di Tesi, abbiamo scelto di sfruttare il protocollo di differenziamento neuronale di cellule ES umane, descritto dal gruppo del Prof. Studer nel 2009 (Chambers et al., 2009) tramite la doppia inibizione del *pathway* di BMP e SMAD (Fig. 2.4).

Combinando il trattamento di Noggin con SB431542, si ottiene infatti l'inibizione della fosforilazione di attivina e recettori di TGF $\beta$ , bloccando a valle il *signaling* mediato da Smad2/3. È possibile così ottenere una massiccia ed omogenea induzione neurale delle cellule hES. Il protocollo prevede che le cellule hES, dopo essere state dissociate a cellule singole, vengano piastrate su matrigel e mantenute in medium di proliferazione con l'aggiunta di FGF2. Raggiunta la confluenza, al medium vengono aggiunti i due inibitori, Noggin e SB431542, mantenuti per 11 giorni, fino a quando si osserva la comparsa di rosette neurali, identificate dai marcatori di neuroectoderma PAX6 e SOX1. Nel lavoro si osserva come l'utilizzo in combinazione dei due inibitori porti ad un'induzione neurale dell'80% delle cellule, rispetto al 10% di cellule PAX6 positive osservato se i due inibitori vengono usati singolarmente (Chambers et al., 2009). Le cellule PAX6 positive esprimono inoltre marcatori tipici del CNS anteriore, quali OTX2 e FOXG1 confermando che le cellule che formano le rosette mostrano un destino anteriore di *default* (Elkabetz et al., 2008). Per dimostrare la capacità dei precursori ottenuti di differenziare terminalmente verso neuroni maturi, dopo opportuna regionalizzazione, si è studiata la loro attitudine a diventare neuroni dopaminergici e motoneuroni. Alla fine del differenziamento, infatti, i neuroni ottenuti esprimono marcatori specifici per neuroni dopaminergici, come la tirosina idrossilasi (TH), e di motoneuroni, come HB9 (Chambers et al., 2009), dimostrando come progenitori neurali del CNS, ottenuti con questo protocollo, siano in grado di differenziare verso fenotipi neuronali diversi tra loro, in presenza di opportuni segnali. Nel 2013 Delli Carri e colleghi hanno mostrato come sfruttando tale protocollo e aggiungendo opportunamente morfogeni chiave della regionalizzazione antero-ventrale del telencefalo, sia possibile ottenere *in vitro* una popolazione arricchita in neuroni striatali, la sottopopolazione che degenera durante l'HD (Carri et al., 2013).

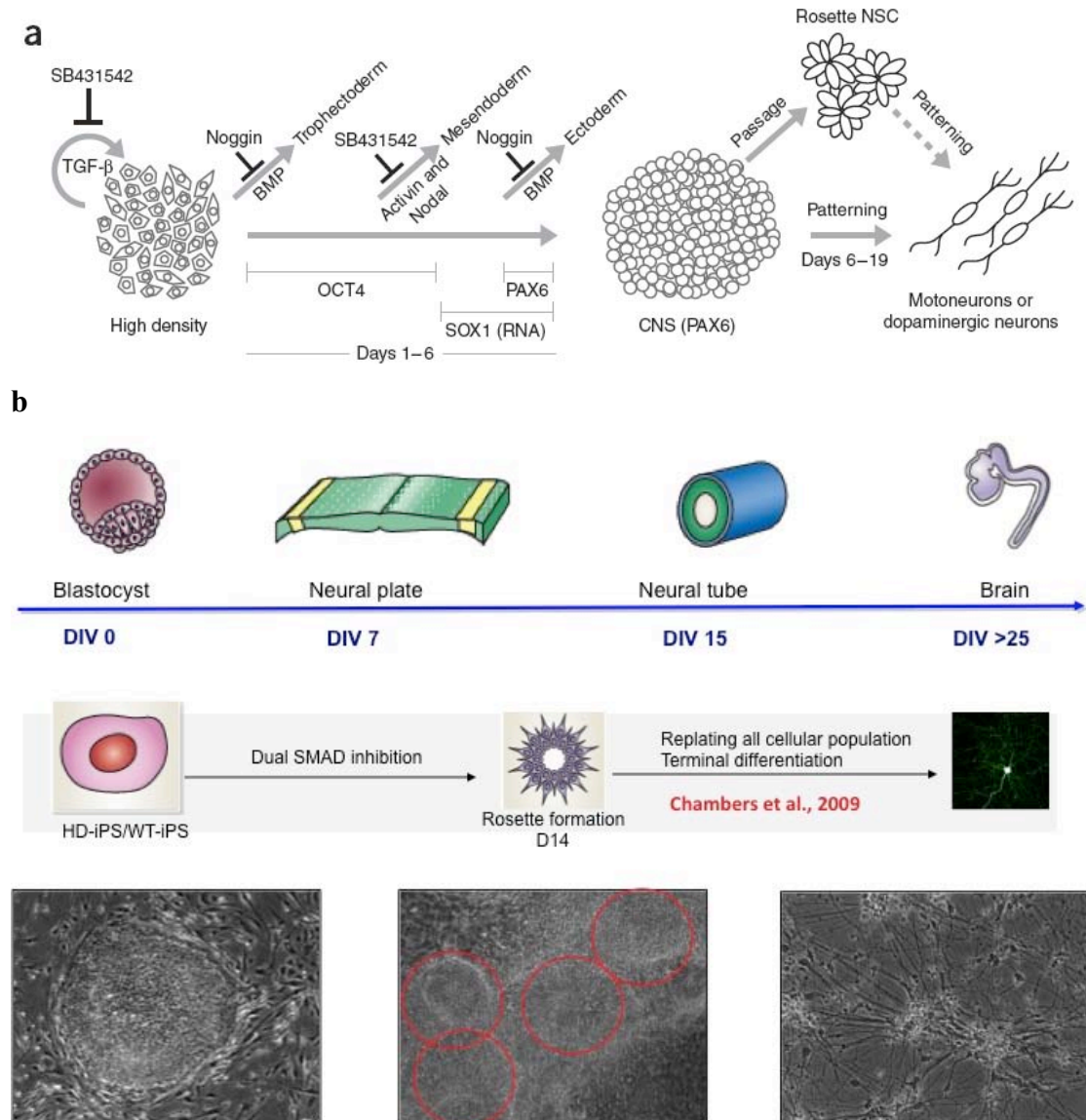


Figura 2.4 Schema del protocollo utilizzato per il differenziamento neuronale di cellule pluripotenti umane. (A) Rappresentazione grafica del protocollo descritto da Chambers *et al.*, 2009. (B) Morfologia di cellule iPS in condizioni di pluripotenza, dopo 14 giorni di induzione neurale (progenitori organizzati in rosette) e dopo 30 giorni di differenziamento (neuroni).



### 3.4 La proteina htt: meccanismi patogenetici molecolari nell'HD

L'ipotesi che l'HD insorga in seguito all'acquisizione di un'attività tossica da parte dell'huntintina mutata, è alla base della teoria del *gain of function*.

La prima evidenza sperimentale di *gain of function*, deriva dalla dimostrazione che la delezione di una estesa porzione del cromosoma 4, su cui mappa il gene malattia IT15, non causa la patologia (Cattaneo et al., 2001). Altre evidenze sperimentali che sostengono questa tesi si basano su studi condotti in topi *knock-out* eterozigoti per l'htt. In questi modelli animali non è stata osservata nessuna alterazione del fenotipo e ciò ha portato ad escludere un coinvolgimento dell'htt sana nella patologia (Duyao et al., 1995; Zeitlin et al., 1995). Inoltre, altre osservazioni condotte su pazienti Huntington eterozigoti ed omozigoti che non mostravano alcuna divergenza nella sintomatologia, hanno contribuito ad indirizzare i ricercatori verso l'individuazione delle possibili funzioni tossiche acquisite dell'htt mutata (Wexler et al., 1987; Durr et al., 1999).

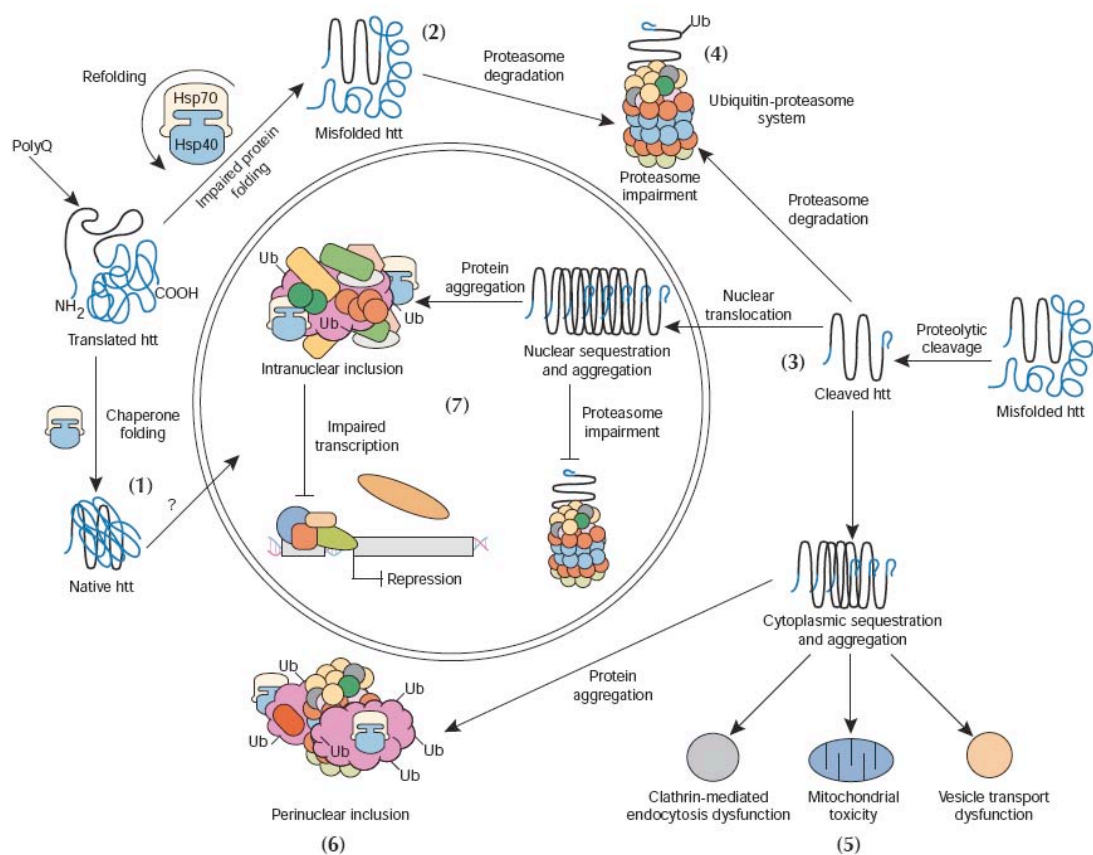


Figura 2.5 Modello schematico dei meccanismi patogenetici nell'HD.



L'esatta causa che porta l'htt ad assumere una funzione tossica per i neuroni gabaergici striatali non è ancora univocamente stata scoperta. Esistono però moltissimi studi che hanno permesso di identificare i meccanismi molecolari che vengono alterati dalla presenza della proteina mutata, che spaziano dalla deregolazione trascrizionale, trasporto vescicolare, fino a disfunzioni mitocondriali e danni al sistema del proteasoma (Fig 2.5).

### **3.4.1 Proteolisi dell'htt mutata, formazione di aggregati e autofagia**

Un fenomeno che si verifica a livello cellulare nell'HD è la degradazione enzimatica dell'htt mutata in frammenti più corti, che acquistano la capacità di migrare verso il nucleo e sono coinvolti nella formazione di aggregati che sembrano ricoprire un ruolo tossico all'interno della cellula. Le proteine responsabili del taglio dell'htt mutata sono le caspasi, effettori finali nella cascata apoptotica.

Sia la forma sana sia quella mutata della proteina risultano essere substrato della caspasi-3. In particolare, la cinetica enzimatica aumenta notevolmente in presenza della mutazione. L'azione delle caspasi porta dunque all'ottenimento di diversi frammenti dell'htt mutata, che sono così in grado di attraversare la membrana nucleare, e dare origine ad inclusioni. E' stato osservato che tali frammenti si accumulano preferenzialmente nel nucleo dei neuroni corticali (Wellington and Hayden, 2000).

Kim e collaboratori hanno individuato nelle calpaine, cistein-proteasi calcio attivate, una classe di proteine implicate nella degradazione dell'htt sana e mutata. In particolare sembra che esse intervengano nell'ulteriore taglio dei frammenti già processati dalla caspasi-3, generando peptidi di dimensioni minori che possono a loro volta formare altri aggregati (Kim et al., 2001).

In presenza degli aggregati, la cellula reagisce con alcuni meccanismi di difesa: le proteine vengono poli-ubiquitinate e indirizzate verso il proteasoma per essere degradate. Il sistema viene però ingolfato dalla presenza di peptidi contenenti un lungo tratto poli-Q, portandone al blocco funzionale (Bennett et al., 2007; Jana et al., 2001).

Nel 2004 inoltre è stato descritto per la prima volta che gli aggregati di htt mutata possono sequestrare il target mTOR e stimolare in questo modo il *pathway* autofagico (Ravikumar et al., 2004). Se inizialmente la stimolazione dell'autofagia esercita un ruolo protettivo nello smaltimento dei frammenti tossici di proteina mutata, a lungo

termine il sistema, continuamente stimolato, non è in grado di effettuare correttamente lo smaltimento fisiologico delle altre proteine cellulari e contribuisce ad aumentare la tossicità stessa.

### **3.4.2 Alterazione della trascrizione genica**

Numerosi fattori trascrizionali sono in grado di interagire con l'htt sana suggerendo un coinvolgimento di quest'ultima nell'espressione genica. In presenza di htt mutata, i diversi fattori vengono sequestrati negli aggregati tossici e questo porta ad una sostanziale diminuzione dell'espressione genica di diversi geni target.

I livelli di neurotrofina BDNF (vedi capitolo 1) sono quelli maggiormente alterati dalla presenza della mutazione e si pensa che ciò possa avere un ruolo preponderante durante la selettiva degenerazione neuronale. Ci sono per questo motivo numerosi approcci in esame per cercare di aumentare l'approvvigionamento di tale neurotrofina nei pazienti.

L'htt mutata è inoltre in grado di interagire con la proteina *CREB Binding Protein* (CBP), un fattore trascrizionale coinvolto nella formazione del complesso *cyclic-AMP response element binding factor* (CREB) (Nucifora et al., 2001; Steffan et al., 2001).

L'htt mutata interagisce inoltre col fattore trascrizionale TAFII130, appartenente al complesso trascrizionale *TATA Binding Protein* (TBP) ed elemento fondamentale per l'attività della RNA polimerasi II (Shimohata et al., 2000; Dunah et al., 2002) assieme ai corepressori N-CoR (*Nuclear Corepressor Receptor*), m-Sin3a (*Nuclear corepressor Sin3a*) e il fattore trascrizionale Sp1 (Dunah et al., 2002; Li et al., 2002).

I geni, la cui espressione viene modificata, sono coinvolti nel metabolismo lipidico, nel *signalling* cellulare, nel traffico vescicolare, nel processamento dell'RNA, nella neurotrasmissione e nel metabolismo lipidico (Sipione et al., 2002).

### **3.5 I modelli malattia iPS-HD in letteratura**

Le malattie neurodegenerative sono state le prime ad essere studiate grazie alla tecnologia delle cellule iPS. Infatti tramite riprogrammazione e successivo differenziamento neuronale si è potuto accedere ad una enorme quantità di materiale per lo studio e la modellizzazione di queste patologie in vitro, impensabile fino a pochi anni fa. In tabella 2 riportiamo tutte le sindromi neurologiche delle quali sono già state derivate linee di cellule iPS.

Al momento dell'inizio del progetto sulla generazione di cellule iPS a partire da fibroblasti di pazienti Huntington, in letteratura erano riportate solamente due linee di cellule hES portatrici della mutazione per l'HD derivate da diagnosi pre-impianto (Verlinsky et al., 2005; Mateizel et al., 2006; Bradley et al., 2011). Risulta pertanto evidente che esse definiscono una casistica molto limitata ed inoltre non è mai stata valutata la capacità di queste linee di riprodurre un fenotipo correlato all'HD. I pochi esperimenti effettuati su queste linee hanno verificato la capacità delle cellule hES-HD di differenziare verso neuroni.

Il lavoro descritto in questa Tesi di dottorato è stato il primo a mostrare la generazione e l'analisi di diversi cloni di cellule di iPS-HD derivate da fibroblasti di tre diversi pazienti (Camnasio et al., 2012). Nell'anno 2012, successivamente alla nostra pubblicazione, sono stati pubblicati cinque lavori in cui veniva descritta la generazione e caratterizzazione di linee di cellule iPS ottenute da pazienti Huntington (Juopperi et al., 2012; Jeon et al., 2012; Chae et al., 2012; An et al., 2012; Consortium, 2012).

Disease	Genetic Defect	Neurological Symptoms	Phenotype in hiPSC-Derived Neural Progeny	Therapeutic Approach: Genetic Manipulation or Drug	Reference
Adrenoleukodystrophy	<i>ABCD1</i>	Demyelination and central and peripheral nervous system progressive loss of function	Very long chain fatty acid level was increased in oligodendrocytes	Lovastatin, 4-phenylbutyrate	(Jang et al., 2011)
Alzheimer's disease (AD)	Multifactorial or <i>PS1</i> , <i>PS2</i> , <i>APP</i> duplication	Progressive memory disorientation and impaired cognition	Increased amyloid $\beta$ (A $\beta$ ) secretion, increased phospho-tau (Thr231) and active glycogen synthase kinase-3 $\beta$ (aGSK-3 $\beta$ )	$\gamma$ -secretase inhibitor decreased (A $\beta$ ) secretion $\beta$ -secretase inhibitors reduced phospho-Tau (Thr231) and aGSK-3 $\beta$ levels	(Yagi et al., 2011; Israel et al., 2012)
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	<i>SOD1</i> , <i>VAPB</i> , <i>TDP43</i>	Neuromuscular degeneration and progressive loss of upper and lower motor neurons, causing weakness and paralysis	VAPB: reduced levels of VAPB in motor neurons derived from patients with VAPB mutation TDP43: mutant neurons had elevated levels of soluble and detergent-resistant TDP-43 protein, decreased survival in longitudinal studies, and increased vulnerability to antagonism of the PI3K pathway	N/A	(Dimos et al., 2008; Mitne-Neto et al., 2011; Egawa et al., 2012)
Huntington's disease (HD)	CAG repeat expansion in Huntingtin gene ( <i>HTT</i> )	Progressive chorea and dementia associated with loss of striatal medium spiny neurons and cortical neurons	HD-neural stem cells showed susceptibility stress; vulnerability to BDNF withdrawn, increased cell death and altered mitochondria bioenergetics. Formation of protein aggregate inclusions after treatment with proteasome inhibitor (MG132). Vacuolation in HD-astrocytes. Increase in lysosomal activity in HD-IPS cells	Genetic correction by homologous recombination	(Zhang et al., 2010; An et al., 2012; Camnasio et al., 2012; Chae et al., 2012; HD iPSC Consortium, 2012)
Familial dysautonomia (FD)	<i>IKBKAP</i>	Degeneration of sensory and autonomic neurons	Decreased expression of genes involved in neurogenesis and neuronal differentiation; defects in neural crest migration	Kinetin	(Lee et al., 2009)
Parkinson's disease (PD)	<i>LRRK2</i> , <i>PINK1</i> , <i>SNCA</i> and <i>Parkin</i>	Age-related degeneration of both central and peripheral nervous systems	Impaired mitochondrial function in PINK1-mutated dopaminergic neurons; sensitivity to oxidative stress in LRRK2 and SNCA-mutant neurons. Reduced dopamine reuptake and increase of spontaneous dopamine release	N/A	(Devine et al., 2011; Nguyen et al., 2011; Seibler et al., 2011; Jiang et al., 2012; Peng et al., 2013)
Rett syndrome (RTT)	<i>MeCP2</i> <i>CDKL5</i>	Large spectrum of autistic characteristics, impaired motor function, regression of developmental skills, hypotonia, seizures; atypical Rett syndrome has clinical features closely related to Rett syndrome, including intellectual disability, early-onset intractable epilepsy starting before the age of 6 months, and autism	MeCP2: neuronal maturation defects, decreased synapse number, reduced number of spines, smaller cell soma size, and elevated LINE1 retrotransposition CDKL5: aberrant dendritic spines	Insulin growth factor 1(IGF1), gentamicin	(Marchetto et al., 2010; Muotri et al., 2010; Ananiev et al., 2011; Koch et al., 2011; Ricciardi et al., 2012; Weinacht et al., 2012)
Schizophrenia	Multifactorial	Neuropsychiatric disease characterized by hallucinations, delusions, and disorganized speech. Pathological hallmarks involve aberrant neurotransmitter signaling, reduced dendritic arborization, and impaired myelination	Diminished neuronal connectivity and decreased neurite number, PSD95 and glutamate receptor expression. Increase in extramitochondrial oxygen consumption and elevated levels of reactive oxygen species (ROS)	Loxapine, valproic acid	(Brennan et al., 2011; Paulsen et al., 2012; Pedrosa et al., 2011)
Spinal muscular atrophy (SMA)	<i>SMN1</i>	Selective loss of lower motor neurons resulting in muscle weakness and paralysis	Reduced size and number of SMA-mutant motor neurons	Valproic acid, tobramycin	(Ebert et al., 2009)
Timothy syndrome	<i>CACNA1C</i>	Long-QT syndrome Neurological defects, autistic characteristics	Decreased expression of genes that are expressed in lower cortical layers and in callosal projection neurons, abnormal expression of tyrosine hydroxylase and increased production of norepinephrine and dopamine, activity-dependent dendritic retraction	Roscovitine Expression of RGK protein, <i>Gem</i> .	(Pasca et al., 2011; Yazawa et al., 2011)
Machado-Joseph Disease	<i>MJD1</i> ( <i>ATXN3</i> )	Dominantly inherited late-onset neurodegenerative disorder caused by expansion of polyglutamine (polyQ)-encoding CAG repeats in the <i>MJD1</i> gene	Excitation-induced ataxin-3 aggregation in differentiated neurons	Elimination of SDS-insoluble fraction by Calpain inhibitors (ALLN, calpeptin)	(Koch et al., 2011)
DOWN syndrome (DS)	Trisomy 21	Mental delay, early-onset Alzheimer's disease	Cortical neurons develop AD pathologies: secretion of the pathogenic peptide fragment amyloid- $\beta$ 42 (A $\beta$ 42) and formation of insoluble amyloid aggregates. Presence of hyperphosphorylated tau protein on cell bodies and dendrites	$\gamma$ -secretase inhibitor decreased (A $\beta$ ) secretion	(Park et al., 2008; Shi et al., 2012)

Tabella 2. Tabella riassuntiva delle linee di cellule iPS generate da pazienti con la malattie neurodegenerative, tratto da (Yu et al., 2013).

I lavori ad oggi disponibili in letteratura sono i seguenti e sostanzialmente si sono focalizzati sull'analisi di una singola linea:

Park *et al.*, 2008: gli autori hanno riportato la generazione di cellule iPS-HD a partire da fibroblasti di un paziente portatore di 72 ripetizioni del tratto CAG. Nel lavoro non

viene analizzato il potenziale differenziativo della linea cellulare e nessun fenotipo associato alla malattia (Park et al., 2008).

Zhang et al., 2010: il gruppo della Dott.ssa Ellerby ha analizzato la linea generata nel lavoro di Park e collaboratori identificando un'attività della caspasi 3/7 più alta rispetto ad una linea controllo, in una condizione di rimozione di fattori di crescita. La linea è stata anche differenziata verso neuroni GABAergici esprimenti DARPP-32, secondo un protocollo di conversione neurale non descritto dettagliatamente (Zhang et al., 2010).

Juopperi et al., 2012: in questo lavoro, cellule iPS derivate da pazienti portatori di 109 e 50 ripetizioni del tratto CAG sono state differenziate verso astrociti, mostrando una maggiore vacuolizzazione citoplasmatica rispetto alle linee controllo (Juopperi et al., 2012).

Jeon et al., 2012: in questo lavoro è stata analizzata la linea di cellule iPS descritta da Park et al., nel 2008. Le cellule sono state differenziate *in vitro* verso neuroni GABAergici nei quali è stata osservata la presenza di aggregati in seguito al trattamento con l'inibitore del proteasoma MG132. Questo tipo di trattamento conferisce uno stimolo stressante al sistema. Gli aggregati sono stati osservati anche in cellule trapiantate in cervelli di topo e analizzati dopo circa 9 mesi (Jeon et al., 2012).

Chae et al., 2012: sulla stessa linea analizzata da Jeon e collaboratori, gli autori hanno effettuato un'analisi di proteomica comparativa tra cellule iPS WT e iPS-HD nello stato indifferenziato e hanno identificato diverse proteine espresse in maniera diversificata nelle due popolazioni, coinvolte in diversi processi biologici come lo stress ossidativo e l'apoptosi. Per alcuni studi è stata inserita una seconda linea di iPS derivata dallo stesso paziente (Chae et al., 2012).

An et al., 2012: ancora una volta in questo lavoro del gruppo della Dott.ssa Ellerby è stata analizzata la linea di cellule iPS portatrice di 72 ripetizioni del tratto CAG, già studiata nel lavoro precedente (Park et al., 2008; Zhang et al., 2010). Gli autori hanno descritto la correzione della mutazione tramite ricombinazione omologa; la linea generata mostra reversione dell'attività della caspasi 3/7 a livelli fisiologici (fenotipo descritto in Zhang et al., 2010) (An et al., 2012).

HD-iPS Consortium 2012: questo lavoro ha coinvolto diversi laboratori europei e americani che hanno unito le forze per identificare fenotipi Huntington in diverse linee di cellule iPS-HD portatrici di 33, 60 e 180 CAG. Le linee sono state generate tramite infezione di 6 fattori di riprogrammazione e i fenotipi sono stati analizzati su una popolazione di progenitori neurali generata in seguito all'applicazione di un protocollo

di differenziamento neurale. Ciò ha portato all'identificazione di difetti di aggregazione cellulare, apoptosi, produzione di BDNF e tossicità da glutammato (Consortium, 2012).

Risulta dunque evidente la necessità di produrre e analizzare un numero superiore di cloni di cellule iPS derivate da diversi pazienti. Questo per cercare di aumentare la numerosità di replicati biologici e ottenere risultati più affidabili, considerando l'alta variabilità che le condizioni di coltura *in vitro* possono generare. Proprio con questo obiettivo, descriveremo nel dettaglio la generazione, la caratterizzazione, il differenziamento e l'analisi di fenotipi in diverse linee di iPS derivate da pazienti HD eterozigoti e omozigoti per la mutazione.

## **Materiali e Metodi**

### **Coltura di cellule pluripotenti murine**

Le cellule mES sono state mantenute in coltura in terreno GMEM (Glasgow Minimal Essential Medium - Sigma) addizionato con siero fetale bovino (FBS - EuroClone) al 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1mM (GIBCO), aminoacidi non essenziali 100 $\mu$ M (GIBCO), sodio piruvato 1mM (GIBCO), L-glutamina 2mM (EuroClone), penicillina 100U/mL (EuroClone), streptomicina 100 $\mu$ g/mL (EuroClone) e *Leukemia Inhibitor Factor* 1000U/mL (LIF ESGRO, Chemicon). Le cellule sono state coltivate in piastre di coltura da 25 cm<sup>2</sup> (T-25 flask; Iwaki), precedentemente trattate con gelatina (gelatina allo 0.1% ottenuta da gelatina in polvere, disciolta in H<sub>2</sub>O deionizzata, Sigma) e splittate con un rapporto 1:6.

### **Differenziamento neurale di cellule mES in monostrato**

Le cellule mES indifferenziate sono state staccate dalla flask mediante tripsina e risospese direttamente nel medium di differenziamento, N2B27 (50% DMEM/F12 21331 (GIBCO) e 50% terreno Neurobasal (GIBCO), addizionato di N2 (100x, GIBCO), B27 (50x, GIBCO) e  $\beta$ -mercaptoetanol (GIBCO) allo 0.2%). Le cellule sono state piastrate in piastre rivestite di gelatina allo 0.1% alla densità di 1-1.5\*10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>. Il terreno è stato rinnovato ogni 24 ore.

### **Nucleofezione di mES e isolamento di cloni stabili**

4.0\*10<sup>6</sup> di cellule sono state risospese in 100  $\mu$ L di soluzione di nucleofezione. 5  $\mu$ g di plasmide totale vengono utilizzati per la reazione di trasfezione utilizzando il programma A-24, specifico per cellule mES.

Per la generazione delle linee stabili, dopo 24 ore dalla nucleofezione, è stato aggiunto un terreno di coltura contenente l'antibiotico opportuno per la selezione. Rinnovando il terreno ogni 24-48 ore per 15 giorni, le cellule resistenti alla selezione sono state raccolte e sottoposte a RealTime-PCR per verificare l'espressione del transgene.

### **Coltura di cellule pluripotenti umane**

La linea cellulare hES H9 e le linee di cellule iPS sono state mantenute in coltura come descritto in Chambers *et al.*, 2012. Per quanto riguarda l'induzione neurale, le cellule sono state piastrate come descritto in Chambers *et al.*, 2009, alla densità di 0.7\*10<sup>5</sup> cellule/cm<sup>2</sup> su piastre rivestite di Matrigel<sup>TM</sup> (Becton Dickinson) in medium hES condizionato da MEF con l'aggiunta di 10 ng/ml FGF-2 e 10  $\mu$ M ROCK *inhibitor*



(Sigma). Le cellule vengono espanse per tre giorni fino quasi a raggiungere la confluenza. Il medium iniziale di differenziamento è composto da KnockOut™ Serum Replacement medium addizionato di noggin 500 ng/ml (in alternativa 5  $\mu$ M dorsomorfina, Sigma) e 10  $\mu$ M SB431542 (Tocris), mantenuti fino al giorno 12. Ogni 2 giorni il medium viene sostituito con medium fresco contenente una proporzione crescente di N2 medium (25%, 50%, 75%). Al giorno 15 l'intera popolazione cellulare viene staccata con Accutase e ripiastrata su piastre rivestite da poly-Dlisina/ laminina o Matrigel. Le cellule vengono quindi mantenute in medium di differenziamento terminale composto da N2 medium addizionato di B27 (Invitrogen) e 30 ng/ml BDNF (Peprotech).

### **Coltura di fibroblasti ed infezione**

Biopsie di pelle sono state ottenute da pazienti dell'istituto neurologico "C. Besta" di Milano. I pazienti hanno fornito il loro consenso scritto per l'uso delle biopsie e per il loro utilizzo a scopo di ricerca. I fibroblasti sono stati coltivati in DMEM *high glucose* (Euroclone), 10% FBS (Euroclone), 2 mM L-Glutamine (Euroclone), and 1% penicillina/streptomicina (Invitrogen). Sono state piastrate  $1.5 \times 10^4$  cellule in piastre da 6-well ed è stata effettuata l'infezione con il costrutto lentivirale policistronico codificante per i fattori di trascrizione *OCT4*, *SOX2*, and *KLF4* (OSK, con o senza *C-MYC*), in presenza di 4  $\mu$ g/ml di polibrene. Dopo una settimana, i fibroblasti infettati sono stati ripiastrati su un *feeder layer* di fibroblasti murini embrionali (MEFs dallo strain CD1)  $3.5 \times 10^4$  cellule/cm<sup>2</sup>, o su fibroblasti neonatali Foreskin ( $3.5 \times 10^4$  cellule/cm<sup>2</sup>) in Knock-out-DMEM (Invitrogen) addizionato con 20% Knock-out serum replacement (Invitrogen), 2 mM L-Glutamine (Euroclone), 2 mM di amminoacidi non essenziali (Invitrogen), 1% penicillina/streptomicina (Invitrogen) e 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoetanolo (Invitrogen), con 10 ng/ml di bFGF (Invitrogen). Le colonie hanno iniziato ad apparire dopo 30 giorni. Intorno al giorno 40 sono state isolate e trasferite su un nuovo *feeder-layer* con le stesse condizioni di cultura. I cloni di cellule iPS sono stati poi passati manualmente ogni 5-7 giorni e le regioni indifferenziate sono state trasferite su un nuovo *feeder-layer*. Nei nostri esperimenti sono state utilizzate solo colonie indifferenziate.

### **Differenziamento verso corpi embrioidi**

Sono state distaccate colonie intere di cellule hES, WT e HD-iPS tramite incubazione

con Collagenasi IV (Invitrogen) per 40 min; successivamente le cellule sono state coltivate in medium hES senza l'aggiunta di bFGF. Dopo 7 giorni si sono formati gli EBs, poi piastrati su gelatina 0.1% (Sigma Aldrich) e il medium è stato cambiato ogni 3 giorni.

### **Saggio del teratoma**

Per verificare la pluripotenza delle cellule HD-iPS *in vivo*, queste sono state manualmente staccate dal *feeder-layer* di fibroblasti umani e risospese in Matrigel™ (BD, Becton Dickinson). Successivamente, sono stati iniettati per via subcutanea 200 µl di cellule risospese in Matrigel (~10<sup>6</sup> cellule), in quattro topi, con severa immunodeficienza combinata (SCID), a 7 settimane di età (C.B.-17/GbmsTac-scidbgDF N7, M&B, Ry, Denmark). Come controllo sono stati iniettati altri quattro animali con un'altra preparazione di cellule derivate dalla stessa linea cellulare. I topi sono stati seguiti, ed è stata osservata la formazione di teratoma. Dopo sei settimane i topi sono stati sacrificati e sono stati prelevati i teratomi, successivamente fissati in 4% PFA, preparati per l'istologia e inclusi in paraffina. La morfologia dei tessuti è stata analizzata dopo marcatura con ematossilina ed eosina. Per verificare la presenza delle diverse strutture sono state effettuate diverse marcature tramite Bond-Max automatic immunostainer (Leica Microsystems) con anticorpi diretti contro Alfafetoproteina (AFP) (Novocastra), Glipicano3 (GPC3) (Biomosaics) e OCT 3/4 (Novocastra).

### **Produzione di vettori virali**

Il vettore di riprogrammazione STEMCCA codificante per i quattro fattori (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, e *C-MYC*) è stato gentilmente concesso da G. Mostoslavsky.

È stato anche preparato uno *stock* di vettore di riprogrammazione codificante per i tre fattori (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*), come già descritto (Follenzi and Naldini, 2002).

Brevemente, cellule 293T sono state co-trasfettate con i 4 vettori con il metodo del calcio fosfato; i vettori sono

pCCLsin.PPT.pA.TK.mCMV.SFFV.OCT3/4\_FMDV2A\_KLF4\_TaV

2A\_SOX2.Wpre.3'LTR\_loxP transfer vector plasmid (36 µg); il plasmide di *packaging* pMD.Lg/pRRE (12.5 µg); the pMD2.VSV-G envelope-encoding plasmid (9 µg); e pCMV-Rev (6.25 µg). I quattro vettori sono stati aggiunti alle cellule in piastre da 15 cm, ed è stato aggiunto 1 mM sodio butirato al medium raccolto. Le particelle virali sono state concentrate di 250 volte tramite ultracentrifugazione e misurate con HIV-1

Gag p24 *immunocapture assay* (Perkin Elmer).

### **Analisi di espressione genica**

Sono stati analizzati 36 ng di cDNA preparato in duplicato tramite il termociclatore 7 Real-time PCR con Hs03005111\_91 TaqMan® *Gene Expression Assay* (Applied Biosystems). È stato analizzato OCT4 e i seguenti primers e sonde sono stati utilizzati per amplificare i trascritti derivati dal vettore (per identificare la sequenza 3'UTR del vettore): Forward primer: 5'- GGCTGTTGGGCACTGACAAT-3' 900 nM, Reverse primer: 5'-ACGTCCCGCGCAGAATC-3' 900 nM, Probe: 5'-6-FAMTTTCCATGGCTGCTCGCCGT-MGB-3' 250 nM. Sono state usate le condizioni standard per l'amplificazione tramite TaqMan. È stato usato il *software* T Viia 7 RUO Software 1.0 per estrarre i dati (Ct e fluorescenza di base). L'espressione relativa di ogni gene è stata calcolata con il metodo  $\Delta\Delta C_t$ , normalizzata sull'espressione del gene *HPRT* (gene *housekeeping*). I risultati sono presentati come incremento relativo rispetto ai fibroblasti infettati da 10 giorni.

### **Analisi del numero di copie del vettore**

L'analisi di PCR quantitativa è stata effettuata come descritto in (Lombardo et al., 2007). Brevemente, 200 ng di DNA genomico è stato analizzato con i *primers* e le sonde complementari alla sequenza del vettore *backbone* ( $\psi$ -PBS) e al gene umano *TERT*; quest'ultimo usato per la normalizzazione. È stata generata una curva standard del  $\psi$ -PBS tramite diluizioni seriali di DNA di cellule umane contenenti un numero noto di integrazioni del vettore.

### **Estrazione di RNA**

L'RNA è stato raccolto in Trizol (Invitrogen) e successivamente estratto; i controlli positivi sono rappresentati da RNA di cervello fetale umano (Clontech) e striato fetale umano. Prima della reazione di trascrizione inversa, l'RNA ha subito un trattamento con DNasi I ed è stato purificato usando il kit RNeasy kit (Qiagen). È stato retro-trascritto 1  $\mu$ g di RNA usando SuperScript RT-III, seguendo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice (Invitrogen).

### **Analisi di RT-PCR e RT-qPCR**

In seguito alla retro-trascrizione, le reazioni di PCR sono state eseguite in un volume di

25 µl contenenti 25 ng di cDNA utilizzando l'enzima Taq polymerase (Invitrogen). Per le analisi di RT-qPCR, sono state utilizzate due preparazioni di cDNA ottenute da 2 reazioni indipendenti di retrotrascrizione per ogni campione di RNA. Ogni singolo gene è stato analizzato in triplicato utilizzando la macchina CFX96 Real-Time system (Bio-Rad). Tutte le reazioni sono state eseguite in un volume finale di 20 µl contenenti 50 ng di cDNA, utilizzando il reagente iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad) come viene descritto in Marullo *et al.*, 2010. Per normalizzare i livelli di espressione del gene selezionato sono state utilizzate come controllo interno le sequenze *Expressed Alu repeats* (EAR) (Marullo *et al.*, 2010). Le sequenze dei primers, le temperature di allineamento e le lunghezze dei prodotti di PCR sono consultabili in Tabella 1.

### **Immunofluorescenza**

Le cellule sono state fissate in 4% PFA, permeabilizzate con 0.5% Triton e bloccate con 5% siero fetale bovino. Gli anticorpi primari, raggruppati in Tabella 2, sono stati incubati *overnight* a 4 °C. Gli appropriati anticorpi secondari coniugati al fluoroforo Alexa 488, 568 o 647, sono stati diluiti 1:500 e incubati insieme a Hoechst 33258 (5 µg/ml; Molecular Probes, Invitrogen), reagente utilizzato per l'identificazione dei nuclei. Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio Leica DMI 6000B e analizzate tramite il programma LAS-AF imaging *software*, quindi processate con Adobe Photoshop o ImageJ. Le immagini confocali sono state acquisite utilizzando un microscopio ZEISS LSM 510 dotato di programma AIM 4.2.

### **Citofluorimetria**

Le cellule sono state staccate e fissate con PFA, quindi permeabilizzate in una soluzione contenente 0.2% Tween 20, risospese in FBS ed incubate con l'anticorpo primario di interesse (Tabella 2). L'analisi è stata condotta utilizzando il citofluorimetro FACS Canto II (BD Bioscience) con il programma BD FACSDiva v6.1.3. Per ogni singola analisi sono state analizzate 20,000 cellule.

### **Estrazione e quantificazione di proteine**

Il materiale cellulare è stato lisato in RIPA buffer. Le cellule sono state lavate con PBS e raccolte in RIPA buffer (Tris-HCl 50 mM, pH=8,0; NaCl 150 mM; SDS 0.1%; Nonidet P40 0,1%; Sodium deoxycholate 0.5%) addizionato con PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride) 1 mM e DTT (Dithiothreitol) 1 mM. Con aggiunto un

cocktail di inibitori delle proteasi (SIGMA). Il campione è stato omogeneizzato con un ago 22-G attaccato ad una siringa da 1 mL. Il lisato è stato sonicato (1 ciclo, 30 sec di durata, Bandelin Sonopuls HD 2200). Dopo 30 minuti di incubazione a 4°C, i lisati cellulari sono stati centrifugati per 30 minuti a 12,000 rpm (Biofuge) a 4°C. Il surnatante è stato recuperato e conservato a -80°C.

La concentrazione delle proteine nei lisati proteici è stata valutata tramite il saggio del BCA (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay).

Al campione di proteine è stato aggiunto, ad una concentrazione finale 1x, una soluzione standard di caricamento (Loading Buffer 1x ) così costituita: Tris-HCl 250 mM pH=6,8, SDS 10%, Glicerolo 30%,  $\beta$ -mercaptoetanolo 5% e blu di bromofenolo 0,02%. La soluzione di LB1x e campione proteico è stata bollita a 95-100 °C per 5 minuti e, a seconda delle necessità sperimentali, quantità comprese tra 30 e 80  $\mu$ g di proteine sono state caricate su un gel di SDS-PAGE.

### **Western blot**

Nei nostri esperimenti sono stati utilizzati un gel SDS-PAGE di impaccamento al 3,75% ed un gel di separazione al 6 o 7,5%.

Dopo la corsa elettroforetica, condotta di solito ad un voltaggio di 110 Volt, i campioni sono stati trasferiti su membrana di nitrocellulosa utilizzando uno specifico sistema: Trans Blot Turbo Transfer System (Bio-rad).

Durante l'incubazione con anticorpi specifici il blocco dei siti aspecifici è stato effettuato utilizzando una soluzione di latte al 5% sciolto in TBS-Tween20 0.1% (Tris 10mM pH=7,4; NaCl 150mM; Tween-20 0,1%). Il segnale è stato rilevato tramite ChemiDoc MP (Bio-rad).

### **Immunoprecipitazione**

Sono state utilizzate 500  $\mu$ g di proteine, per ogni immunoprecipitazione, da diluire in un volume finale di 300  $\mu$ L di RIPA buffer.

A 300  $\mu$ L di lisato totale sono stati aggiunti 50  $\mu$ L di proteina G-sefariosio, messo in rotazione per 1 ora a 4°C e, successivamente, centrifugato per 3 minuti a 13,000 rpm a 4°C. È stato recuperato il surnatante. Al surnatante è stato aggiunto l'anticorpo specifico in rotazione a 4°C per tutta la notte, sono stati aggiunti 40  $\mu$ L di proteina G-sefariosio in rotazione per 2 ore a 4°C. Dopo 5 centrifughe per 2 minuti a 13,000 rpm a 4°C, al

pellet è stato aggiunto SB 2x. I campioni sono stati bolliti per 5-6 minuti a 95-100°C, sono stati centrifugati ed il surnatante è stato caricato sul gel per la successiva analisi.

### **Analisi statistica**

I dati ottenuti nelle diverse analisi effettuate in questo lavoro di Tesi sono stati elaborati con il software GraphPad Prism. In particolare è stato utilizzato il test ANOVA (*Analysis of Variance*) ad una via seguito dal Bonferroni post test. E' stato considerato statisticamente significativo un p-value  $\leq 0.05$ .

## **Risultati**

## **Parte 1**

**Identificazione di un nuovo ruolo dell'htt sana nella  
definizione della polarità apico-basale durante la  
conversione neurale di cellule embrionali staminali**



### **1.1 L'assenza di htt causa difetti nella polarizzazione dei progenitori neurali che mimano le alterazioni dovute all'abbattimento dei livelli delle proteine di polarità**

Per studiare il ruolo dell'htt nella regolazione dei processi neurogenici che coinvolgono la generazione di una polarità apico-basale ci si è avvalsi di diverse linee di cellule pluripotenti murine, sottoposte al protocollo di conversione neurale descritto dal gruppo del Prof. Smith 2003 (Ying et al., 2003). Grazie a questo protocollo è possibile valutare in modo rapido ed efficace la propensione di una linea cellulare a dare origine a rosette neurali (dopo circa 7 giorni *in vitro*, o 7 DIV). Le cellule costituenti le rosette seguono il proprio processo differenziativo che porta i progenitori neurali a proliferare nella zona peri-luminale mentre le cellule più mature migrano verso gli strati più esterni. I progenitori neurali che costituiscono le rosette mostrano le stesse caratteristiche antigeniche delle cellule presenti nel tubo neurale durante lo sviluppo (Abranches et al., 2009). Inizialmente è stato confermato che la linea di cellule staminali embrionali *wild type* (WT)  $Hdh^{+/+}$  è in grado di generare un numero molto elevato di rosette neurali, caratterizzate da lumi ben identificabili anche semplicemente al microscopio a contrasto di fase (Fig. 3.1A). Le cellule fissate al DIV7 sono state analizzate tramite immunofluorescenza (IF), e hanno mostrato positività per tipici marcatori associati alla membrana apicale di progenitori neuroepiteliali ZO-1 e aPKC, che si dispongono esattamente a livello luminale. D'altra parte, la linea di cellule staminali embrionali depleta di htt  $Hdh^{ex4-5}$ , generata nel laboratorio della Prof.ssa McDonald (Duyao et al., 1995), non è stata assolutamente in grado di dare origine a progenitori neurali organizzati in strutture organizzate radialmente; le rosette neurali hanno una struttura molto alterata e sono ridotte sia in numero che in dimensione (fenotipo denominato "*rosetteless*"), se comparate alla linea di cellule WT (Fig. 3.1A). Questo fenotipo è coerente con quanto già descritto da Lo Sardo e colleghi nel 2012. Risultati analoghi sono stati osservati anche su una seconda linea cellulare depleta di htt, ottenuta dal gruppo del Prof. Zeitlin e denominata  $Hdh^{pr-ex1}$  (dati non mostrati).

Considerando che difetti a carico del processo di proliferazione e differenziamento di progenitori neurali sono ampiamente descritti in letteratura quando i livelli di proteine di polarità sono alterati, è stato comparato il differenziamento delle cellule  $Hdh^{ex4-5}$  con quello di altre linee di cellule staminali murine in cui alcune proteine di polarità sono state ablate. In letteratura è già stato descritto il differenziamento di una linea di cellule mES depleta di CRB2: le cellule, quando sottoposte al medesimo protocollo di

conversione neurale descritto da Ying e colleghi, non sono in grado di dare origine a rosette e la loro vitalità risulta essere molto ridotta (Boroviak and Rashbass, 2011). Per confermare questa evidenza è stata analizzata un'ulteriore linea cellulare depleta del determinante di polarità CDC42, generata nel laboratorio del Prof. Brakebush (Wu et al., 2007). Numerosi lavori, mirati allo studio dell'importanza della polarità cellulare nello sviluppo neurale, hanno evidenziato un ruolo chiave di CDC42. Wu e colleghi hanno dimostrato che tale linea cellulare possiede difetti nella polarizzazione cellulare, nelle giunzioni cellula-cellula e nella sopravvivenza cellulare. Questi difetti sono associati ad una diminuzione della fosforilazione e conseguente attivazione di aPKC, oltre che ad una sua mancata localizzazione nella regione apicale (Wu et al., 2007).

Applicando il protocollo di conversione neurale il risultato è stato sorprendente: al settimo giorno di differenziamento le cellule, osservate al microscopio a contrasto di fase, presentavano una struttura totalmente disorganizzata. Tramite analisi di IF, è stata osservata una massiccia positività per Nestin, senza però nessuna evidente formazione di strutture organizzate di rosette. A conferma di ciò, la marcatura per ZO-1 è risultata essere completamente negativa. In Fig. 3.1B, l'analisi dimensionale effettuata sulle linee  $Hdh^{+/+}$ ,  $Hdh^{ex4-5}$  e  $CDC42^{-/-}$  riporta chiaramente le differenze osservate a livello di diametro delle rosette neurali identificate.

Il fenotipo *rosetteless* osservato nella linea  $CDC42^{-/-}$  risulta quindi essere ancora più evidente rispetto a quello osservato sulle cellule  $Hdh^{ex4-5}$ , suggerendo così un ruolo preponderante delle proteine di polarità durante la fase di neurogenesi.

Questo esperimento ha permesso di evidenziare una prima connessione tra *htt* e polarità, basata proprio sulla similarità di comportamento durante il differenziamento neurale di linee mES deplete di *htt* e dei determinanti di polarità CRB2 e CDC42.

Inoltre è noto dalla letteratura che in seguito a ridotta espressione di proteine di polarità, le cellule staminali neurali diminuiscono il proprio *rate* proliferativo e tendono ad uscire precocemente dal ciclo cellulare (Costa et al., 2008; Cappello et al., 2006; Kim et al., 2010b). Considerando ciò, è stata valutata la disposizione e l'abbondanza di progenitori esprimenti la proteina phospho istone H3 (pPH3). pPH3 identifica le cellule ciclanti in fase G2-M, localizzate a livello ventricolare nel tubo neurale (Vedi introduzione). Nelle cellule  $Hdh^{+/+}$  la marcatura è associabile a precursori localizzati nella porzione luminale, ricordando esattamente ciò che succede *in vivo* a livello ventricolare (Elkabetz et al., 2008), mentre nelle linee cellulari  $Hdh^{ex4-5}$  e  $CDC42^{-/-}$  i precursori pPH3 positivi sono disposti in maniera assolutamente casuale (Fig. 3.1A). E' stata poi confrontata

l'abbondanza di cellule pPH3 positive tra le linee Hdh<sup>+/+</sup> e Hdh<sup>ex4-5</sup> al DIV 3: dal conteggio effettuato su circa 9000 cellule, è emersa una lieve diminuzione della percentuale di cellule pPH3 positive nella linea di cellule Hdh<sup>ex4-5</sup> (Fig. 3.1C).

Per rafforzare l'analisi di alterazioni a livello del ciclo cellulare, è stato effettuato il saggio di incorporazione del propidio ioduro al fine di discriminare la popolazione di cellule in fase G0-G1, S e G2-M. Tramite analisi citofluorimetrica, è stato possibile separare e quantificare tali popolazioni nelle diverse linee di cellule durante il *time course* DIV3-5-7. La Fig. 3.1D mostra che correttamente, durante i giorni del differenziamento, in entrambe le linee le cellule in fase G0-G1 (fuori dal ciclo cellulare) aumentano, mentre i progenitori in attiva divisione in fase G2-M diminuiscono.

E' interessante osservare come la popolazione in fase G2-M sia una percentuale maggiore nella linea cellulare controllo, e in maniera complementare le cellule in fase G0-G1 sono più numerose nella linea di cellule deplete di htt (Fig. 3.1D). Ciò è facilmente osservabile specialmente nei giorni precoci del differenziamento, confermando una ridotta capacità proliferativa della linea cellulare Hdh<sup>ex4-5</sup>. Questa evidenza ha portato ad ipotizzare che nelle linee *Knock Out* (KO) per l'htt, così come succede per la deplezione di determinati di polarità, i progenitori neurali non sono in grado di proliferare in maniera omogenea e organizzata. Ciò comporta il mancato sviluppo di strutture radiali ordinate, e la formazione di rosette ridotte in numero e dimensioni.

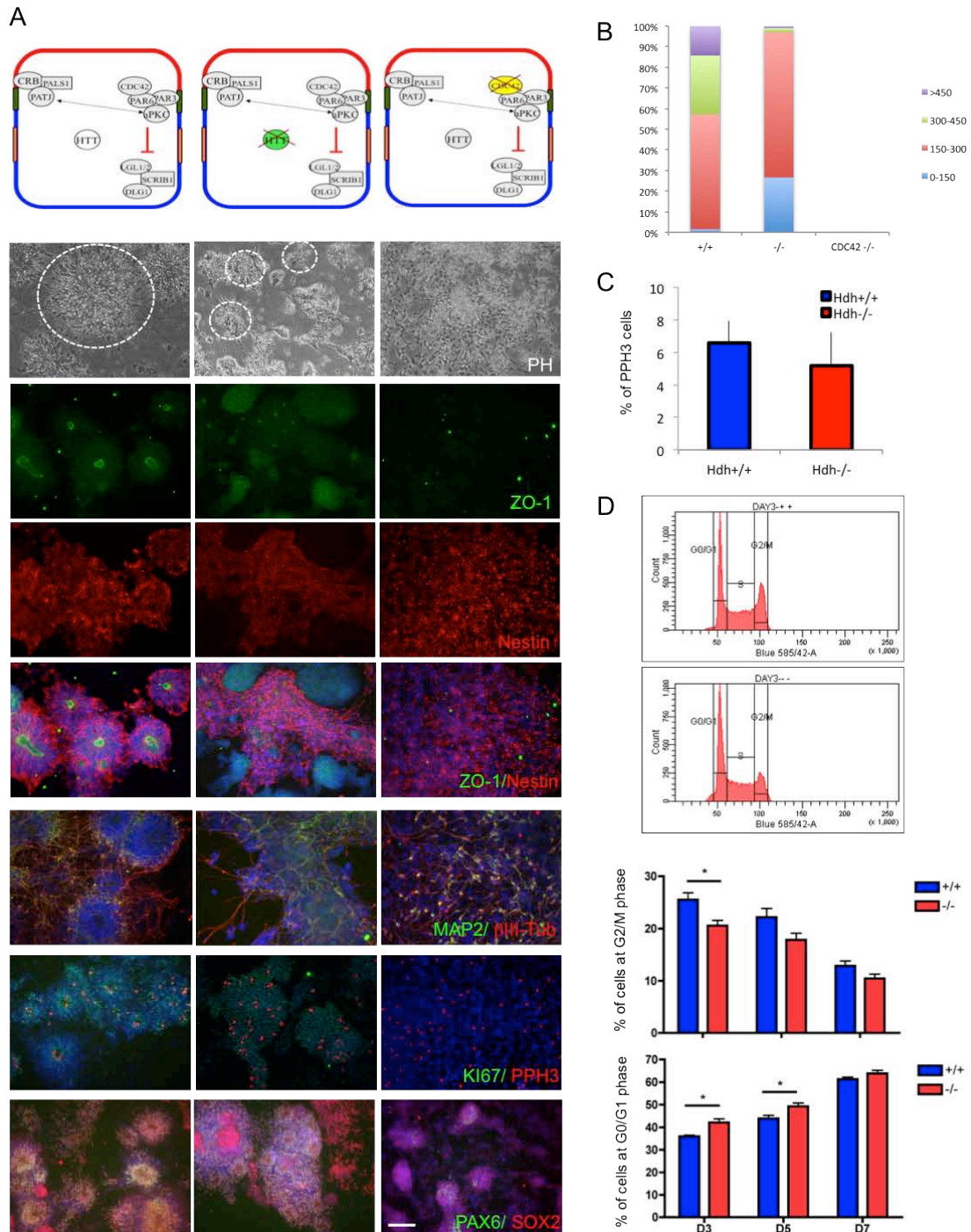


Figura 3.1 L'assenza di *htt* causa difetti di polarizzazione e proliferazione dei progenitori neurali durante il processo di neurulazione *in vitro*. (A) Cellule  $Hdh^{+/+}$ ,  $Hdh^{ex4-5}$  e  $CDC42^{-/-}$  sono state differenziate in senso neurale per 7 DIV ed è stata valutata l'immunopositività per i marcatori: ZO-1 luminale, Nestin neuroepiteliale,  $\beta 3$ -tubulina per neuroni immaturi, MAP2 per neuroni maturi, pPH3 per cellule in fase G2-M, KI67 per cellule ciclianti, PAX6 e SOX2 per misurare l'efficienza di conversione neurale. (B) Analisi dimensionale del diametro delle rosette neurali apparse nelle tre diverse linee. Sono stati analizzati almeno 10 campi per linea cellulare, unità di misura in  $\mu m$ . (C) Quantificazione in percentuale dell'abbondanza di cellule pPH3 positive. Nell'analisi sono stati contati 9000 nuclei. (D) Analisi del

ciclo cellulare delle linee di cellule  $Hdh^{+/+}$  e  $Hdh^{ex4-5}$  tramite saggio del propidio ioduro ed analisi citofluorimetrica. Sono stati analizzati 4 differenziamenti indipendenti per linea cellulare.

Per rinforzare questa evidenza è stata analizzata la marcatura per il tipico fattore di trascrizione neuroepiteliale PAX6 (Fig. 3.1A). Nella linea di cellule WT, PAX6 è presente in maniera organizzata in tutte le cellule che compongono la rosetta, ad eccezione del bordo esterno dove si localizzano le cellule più differenziate, normalmente negative per PAX6 e positive per il marcatore di progenitori basali TBR2 (Germain et al., 2010; Elkabetz et al., 2008; Shi et al., 2012). Nella linea cellulare  $Hdh^{ex4-5}$  invece, sono presenti poche strutture radiali PAX6 positive e numerose aree completamente negative per la marcatura.

Successivamente, l'IF per  $\beta$ 3-tubulina e MAP2, proteine espresse rispettivamente nei primi neurofilamenti di cellule neuroepiteliali e in neuroni maturi, mostra come nelle cellule  $Hdh^{+/+}$  i neuroni compaiono coerentemente con ciò che accade nello sviluppo: in Fig. 3.1A si può infatti osservare come cellule MAP2 positive proiettino i propri assoni a partire dagli strati più esterni della rosetta, tendendo ad esplorare l'ambiente circostante. Nelle linee KO per *htt* e *CDC42*, invece, i neuroni appaiono nuovamente in maniera disorganica, intrecciandosi fra loro senza stabilire un'organizzazione strutturale.

Per approfondire ulteriormente queste osservazioni e caratterizzare al meglio la popolazione cellulare della linea  $Hdh^{ex4-5}$ , è stato esaminato il *timing* di comparsa di progenitori neurali (tramite IF per PAX6), e strutture a rosetta (tramite IF per Nestin e ZO-1), durante i giorni precoci del protocollo di differenziamento (DIV3-4-5). E' interessante notare che nella linea di cellule  $Hdh^{ex4-5}$ , campi neurali Nestin positivi compaiono già dopo 4 DIV, ma immediatamente a partire dal quinto giorno l'organizzazione multicellulare sembra essere persa (Fig. 3.2A). Nella linea cellulare WT l'accensione di Nestin sembra essere più graduale nei giorni e al DIV 5 è già possibile apprezzare la morfologia identificativa di abbozzi di rosette neurali, in cui il segnale di PAX6 è decisamente più acceso rispetto a quanto osservato nei progenitori  $Hdh^{ex4-5}$ .

Questo risultato è in accordo con l'ipotesi formulata che nella linea cellulare depleta di *htt* si assiste ad un'alterazione del corretto bilancio tra la proliferazione dei progenitori neurali e il differenziamento neuronale. Una condizione che ricorda ciò che accade

quando viene diminuita l'espressione di proteine di polarità apicale. Inoltre gli studi di localizzazione e numerosità delle cellule pPH3 positive, il segnale di PAX6 osservato al DIV 7 e le analisi del ciclo cellulare tramite propidio ioduro, danno risposte convergenti con questo ragionamento.

Và sottolineato, inoltre, come i dati descritti siano in linea anche con il lavoro di Godin e colleghi del 2010, in cui abbattendo *in vivo* l'espressione dell'*htt* a E12.5, viene descritta una tendenza dei progenitori neurali ad uscire precocemente dal ciclo cellulare, assottigliando il loro *pool* (Godin et al., 2010).

Infine, per indagare in modo completo il fenotipo associato alla linea cellulare  $Hdh^{ex4-5}$ , è stato eseguito un differenziamento che andasse oltre i 7 DIV, in modo da consentire la completa maturazione neuronale *in vitro*. In questo caso si è attesa la comparsa delle rosette neurali, e poi si è ulteriormente prolungato il differenziamento fino a raggiungere il DIV 21. Il processo di neurogenesi risulta così completo e accompagnato anche dalla normale comparsa di cellule astrocitarie, positive per il tipico marcatore GFAP. La gliogenesi infatti è un evento che, durante il normale sviluppo embrionale, segue temporalmente la neurogenesi (Guillemot, 2007). Comparando nuovamente il differenziamento della linea cellulare controllo con quello della linea cellulare depleta di *htt*, è stato affascinante notare come la linea  $Hdh^{ex4-5}$  possieda una spiccata propensione a generare una quantità superiore di cellule GFAP positive già dopo 13 DIV, e tale comportamento risulta essere più accentuato al DIV 21 (Fig 3.2B). Questo dato rafforza ulteriormente l'ipotesi di un'alterazione del normale processo neurogenico nella linea  $Hdh^{ex4-5}$  sbilanciato verso un differenziamento accelerato. E' interessante, inoltre, riportare un dato dalla letteratura in accordo con quanto descritto riguardo al potenziale gliogenico: nel 2012 infatti, nel nostro laboratorio è descritto il medesimo comportamento in linee di cellule neurali staminali (NSC), generate, in seguito all'applicazione di un protocollo di differenziamento (Conti et al., 2005), a partire da una batteria di linee di cellule mES *knock-in* per *htt* con diverse ripetizione del tratto CAG. Queste linee sono state comparate con NSC controllo e  $Hdh^{ex4-5}$ . Gli autori, allo scopo di identificare specifici fenotipi associati all'espansione del tratto CAG, hanno incluso nell'analisi anche i livelli di GFAP che, in accordo coi nostri risultati, risultano essere maggiori nelle linee cellulari deplete di *htt* (Conforti et al., 2013).

Considerando l'insieme di queste evidenze sperimentali, è possibile formulare l'ipotesi di un collegamento funzionale tra l'azione dell'*htt* e quella delle proteine di polarità

apico-basale, che converge verso il normale processo di controllo del bilanciamento tra proliferazione neuroepiteliale e neurogenesi.

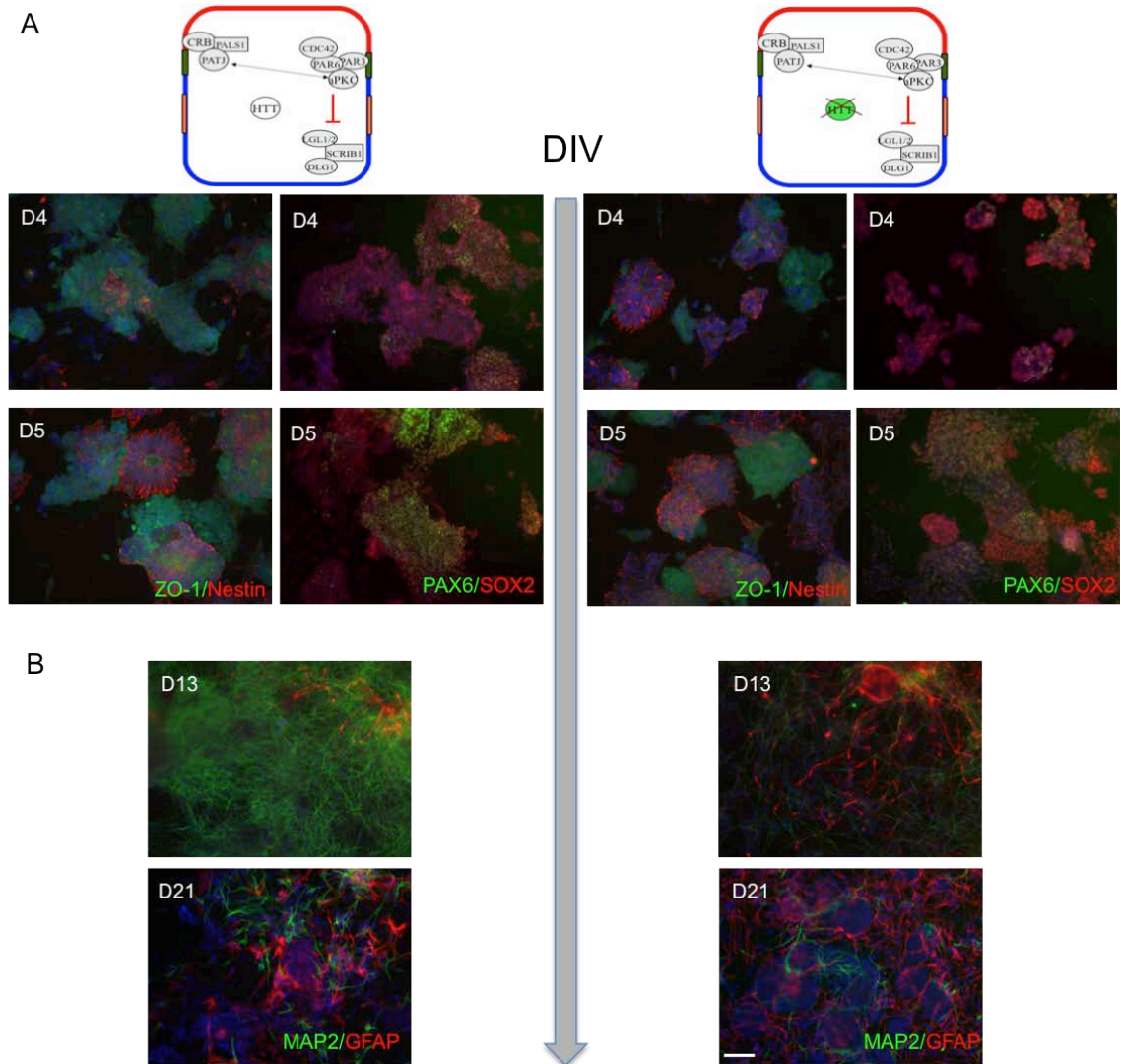


Figura 3.2 Comparazione diretta del processo di differenziamento neurale a giorni precoci e tardivi in presenza o assenza di htt. (A) Durante i giorni precoci del differenziamento (DIV 4 e 5) è stata valutata la comparsa di Nestin, ZO-1 e PAX6, SOX2. (B) A giorni tardivi è stata comparata la quantità del marcatore specifico di astrociti GFAP e MAP2.

## **1.2 L'overespressione di determinanti di polarità apicale è in grado di ripristinare, nelle cellule deplete di htt, il corretto processo di neurulazione *in vitro***

Al fine di verificare la nostra ipotesi di una connessione tra htt e polarità, che si espleta attraverso una possibile azione sinergica durante le fasi precoci del differenziamento neurale, si è deciso di effettuare esperimenti di cross-complementazione tra le diverse linee disponibili in laboratorio e finora descritte. Nello specifico, sono state overesprese proteine di polarità apicale (CDC42 e CRB2) nella linea cellulare Hdh<sup>ex4-5</sup>, e viceversa è stata overespressa l'htt nella linea cellulare depleta di CDC42, per poi valutare un'eventuale reversione del fenotipo *rosetteless*.

E' stato inizialmente ottenuto un plasmide che consentisse l'espressione forzata di CDC42. Ricordiamo che CDC42 è un membro appartenente alla famiglia delle Rho GTPasi che svolge un ruolo centrale nei meccanismi che innescano la polarizzazione cellulare in cellule epiteliali eucariotiche (Etienne-Manneville, 2004). Le cellule Hdh<sup>ex4-5</sup> sono state trasfettate tramite nucleofezione con il plasmide pcDNA3-EGFP-CDC42(Q61L), che codifica per una forma costitutivamente attiva di CDC42, ottenendo una nuova linea cellulare, denominata Hdh<sup>ex4-5</sup>pCDC42. L'overespressione è stata confermata tramite Real Time PCR. Come primo esperimento le cellule Hdh<sup>ex4-5</sup>pCDC42 sono state sottoposte al protocollo di conversione neurale di Ying e collaboratori (ormai validato in laboratorio su diverse linee cellulari). E' stata valutata l'efficienza del differenziamento dopo 7 DIV. Il risultato è stato assolutamente soddisfacente, in quanto si è osservata una completa e replicabile reversione del fenotipo *rosetteless*. La marcatura per Nestin e ZO-1 ha permesso di identificare numerosi campi di rosette, di dimensioni assolutamente riconducibili a quelle della linea cellulare WT, come suggeriscono le immagini in Fig. 3.3A e la relativa analisi dimensionale (Fig. 3.3B).

Inoltre, grazie ad una collaborazione con la Prof.ssa Rashbass dell'Università di Cambridge, è stato possibile utilizzare anche un plasmide per overesprimere CRB2. CRB2 è una proteina transmembrana, la cui espressione è arricchita a livello della membrana apicale di cellule neuroepiteliali. Se CDC42 rappresenta l'iniziatore del processo di polarizzazione cellulare, CRB2 può essere considerato invece una delle proteine deputate a terminare l'intero processo, grazie appunto alla sua azione in membrana che contribuisce alla generazione di un gradiente di proteine tra la porzione apicale e basale della cellula. Anche in questo caso è stata generata una linea stabile di



cellule  $Hdh^{ex4-5}$  overesprimenti CRB2 (chiamata  $Hdh^{ex4-5}$ pCRB2), tramite nucleofezione usando il plasmide pcDNA3.1-CRB2. Sorprendentemente, anche in questo caso il differenziamento neurale di tale linea ha prodotto rosette di dimensione e numero paragonabile a quelle della linea cellulare controllo, nuovamente con una reversione del fenotipo completa e replicabile (Fig. 3.3A).

Come ulteriore conferma che il fenotipo osservato fosse dovuto all'overespressione dei determinanti di polarità CDC42 e CRB2, si è proceduto all'ingegnerizzazione anche della seconda linea depleta di  $htt$   $Hdh^{pr-ex1}$ , precedentemente descritta, con entrambi i plasmidi: anche in questo caso la reversione del fenotipo è stata completa ed efficiente (dati non mostrati).

A questo punto, dopo aver constatato una collaborazione funzionale tra  $htt$  e determinanti di polarità, è stato deciso di approcciare l'esperimento opposto e complementare, ovvero l'overespressione dell' $htt$  nelle cellule  $CDC42^{-/-}$ . Anche in questo caso le cellule sono state trasfettate tramite nucleofezione del costrutto d'interesse pCAG-*M. musculus*-N548, codificante per i primi 548 aminoacidi dell' $htt$ , che è stato dimostrato essere sufficienti a revertire il fenotipo *rosetteless* nelle linee  $Hdh^{ex4-5}$  e  $Hdh^{pr-ex1}$  (Lo Sardo et al., 2012). Dopo aver verificato la validità della nuova linea  $CDC42^{-/-}$ N548 tramite Real Time PCR, si è proceduto con il differenziamento neurale. La linea cellulare  $CDC42^{-/-}$  al settimo giorno del differenziamento neurale non presenta formazione di rosette ma una completa disorganizzazione. In seguito all'overespressione dell' $htt$  si è osservato una parziale reversione del fenotipo, dando origine ad abbozzi di disposizioni cellulari radiali, piuttosto piccoli, ma numerosi. Anche in questa occasione, il lume è identificabile grazie alla marcatura per ZO-1 (Fig. 3.3A).

In Fig. 3.3B è riportata l'analisi dimensionale delle aree occupate dalle diverse rosette identificate nelle tre linee complementate, comparate con le cellule  $Hdh^{+/+}$ . Risulta chiaro che l'overespressione dei determinanti di polarità CDC42 e CRB2 nelle cellule KO per  $htt$  sono in grado di ripristinare completamente i difetti associati al fenotipo *rosetteless*. L'overespressione di  $htt$  nella linea  $CDC42^{-/-}$  invece permette di osservare la formazione di rosette non completamente mature e di dimensioni ridotte, partendo però da una situazione assolutamente priva di strutture radiali.

Per concludere, complessivamente i risultati di cross-complementazione hanno rivelato come esista effettivamente una collaborazione funzionale e congiunta tra  $htt$  e proteine di polarità apicale, volta a promuovere il mantenimento organizzato dei progenitori

neurali in strutture ordinate. Inoltre i determinanti di polarità CDC42 CRB2 sembrano avere un ruolo preminente rispetto a quello dell'htt nell'assicurare che il corretto processo di polarizzazione di cellule neuroepiteliali possa concludersi.

Nella parte successiva si analizzerà a livello molecolare come questa interazione possa essere concretizzata.

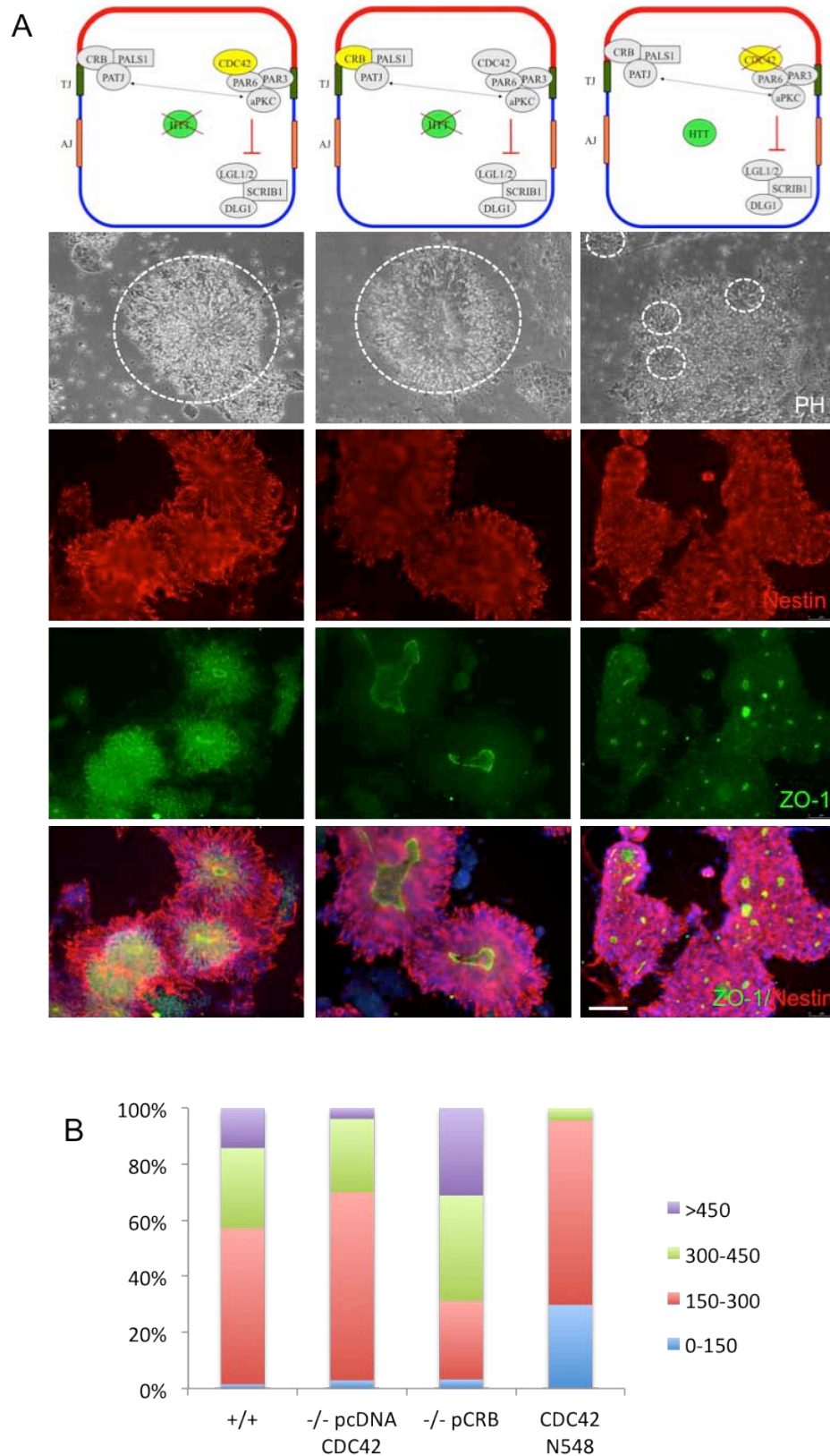


Figura 3.3 Analisi di complementazione della linea  $Hdh^{ex4-5}$  con CDC42 e CRB2 e della linea  $CDC42^{-/-}$  con *htt*. (A) IF per Nestin e ZO-1 per l'identificazione di rosette neurali. (B) Analisi dimensionale del diametro delle rosette effettuata sulle linee complementate, unità di misura in  $\mu m$ .

### 1.3 L'htt sana contribuisce alla stabilizzazione dei livelli di aPKC nei progenitori apicali

Una volta stabilita, tramite diverse indicazioni fenotipiche, l'esistenza di una connessione solida tra htt e proteine di polarità nelle fasi precoci dello sviluppo neurale, è stato approfondito quale meccanismo molecolare potesse essere coinvolto in questa interazione.

Come prima cosa sono stati valutati durante i giorni del differenziamento neurale i livelli di alcune proteine specifiche di polarità apicale, comparando la linea cellulare Hdh<sup>+/+</sup> e Hdh<sup>ex4-5</sup>. La Fig. 3.4A mostra come non esistano particolari differenze per quanto riguarda l'espressione delle proteine PAR3, CRB2 e CDC42. Al contrario, è stata osservata un apprezzabile cambiamento dei livelli di aPKC e soprattutto della sua forma attiva fosforilata. Come descritto precedentemente, aPKC è una protein chinasi la cui attività è stimolata da CDC42 e, interagendo con PAR6, membro del complesso di polarità di PAR, svolge un ruolo primario nei meccanismi che portano alla polarizzazione epiteliale. In particolare aPKC è in grado di fosforilare le proteine LGL, PAR3 e CRB2 (Yamanaka et al., 2003; Sotillos et al., 2004). In questo modo i 3 complessi di polarità possono localizzarsi nel corretto compartimento cellulare per il mantenimento delle caratteristiche polarizzate della cellule neuroepiteliale. Come mostrato in Fig. 3.4A e B, i livelli di aPKC risultano essere alterati nella linea Hdh<sup>ex4-5</sup> in modo particolare al DIV 4, un *time point* cruciale del protocollo di conversione neurale. In questa fase i progenitori neurali cominciano ad acquisire una propria polarità apico-basale e sono in fase di attiva espansione ordinata per contribuire alla formazione della nascente rosetta neurale. Ancora maggiori sono le differenze osservate a livello della forma attiva fosforilata di aPKC: in entrambi i giorni del differenziamento analizzati infatti (DIV4 e 7) le cellule Hdh<sup>ex4-5</sup> mostrano livelli di espressione minore.

Sulla base di quanto osservato, è stato supposto che l'htt possa essere in grado di stabilizzare i livelli di aPKC durante la fase di neurulazione e che questo effetto sia perso nella linea KO. Per verificare questa nostra ipotesi è stato impostato un esperimento di co-immunoprecipitazione (CO-IP) tra htt e aPKC, in modo da stabilire l'esistenza di una possibile interazione fisica tra le due proteine. A tal fine le cellule Hdh<sup>+/+</sup> sono state differenziate fino alla formazione di campi definiti di rosette (DIV 7). A questo punto è stato raccolto il lisato proteico dalle cellule differenziate, ed è stato immunoprecipitato con l'anticorpo specifico per aPKC. Il filtro di Western Blot è stato

dapprima incubato con l'anticorpo anti-aPKC per accertarsi dell'avvenuta immunoprecipitazione. Quindi il medesimo filtro è stato poi incubato con l'anticorpo specifico per l'htt, rivelando una banda specifica di 340 kDa (Fig. 3.4C). Lo stesso risultato è stato poi replicato immunoprecipitando con l'anticorpo specifico per l'htt. Anche in questo caso il filtro analizzato ha rivelato marcata positività per htt e aPKC (Fig. 3.4D).

I risultati di CO-IP, dunque, rafforzano notevolmente la connessione htt-polarità, rivelando inoltre un'interazione fisica tra l'htt e la proteina chiave del complesso di PAR, aPKC.

Successivamente, è stato verificato se la localizzazione dell'htt possa essere osservabile specialmente in prossimità della porzione più apicale dei progenitori neuroepiteliali, a livello dei quali si assiste ad un arricchimento delle proteine di polarità apicale.

Ricordiamo che nelle rosette neurali ottenute tramite protocollo *in vitro* i progenitori neuroepiteliali sono localizzati nella zona peri-luminale, e quindi proprio su tale porzione abbiamo focalizzato la nostra attenzione.

A tal fine è stato effettuato un esperimento di IF su cellule fissate al DIV7, analizzando la positività di anticorpi specifici per l'htt e diverse proteine apicali (ZO-1, aPKC, PAR3 e PALS1). Le immagini raccolte tramite microscopia confocale (Fig. 3.4E) mostrano come la membrana apicale dei progenitori neurali, identificata dalla marcatura per le proteine di polarità, sia precisamente orientata verso la parte più interna della rosetta, permettendo la facile identificazione del lume centrale. La contemporanea marcatura tramite un anticorpo diretto specificatamente verso l'htt, evidenzia come il segnale sia arricchito specialmente a livello di cellule neurali localizzate nella porzione più apicale della rosetta, mentre la porzione più esterna (basale), in cui risiedono normalmente i progenitori basali non polarizzati e i primi neuroni post-mitotici, non presenta alcun tipo di segnale (Fig. 3.4E).

Per confermare quanto osservato *in vitro*, sono state condotte analisi di immunoistochimica su sezioni di corteccia, in embrioni allo stadio di sviluppo (E12.5). Le sezioni di cervello sono state marcate con gli anticorpi specifici per htt e aPKC: l'immagine riportata in Fig. 3.4F permette di identificare la zona ventricolare tra la corteccia (CX) e l'eminanza ganglionica laterale (LGE). aPKC identifica precisamente la membrana apicale tipica della zona neurogenica ventricolare e il segnale dell'htt risulta nuovamente arricchito nella popolazione di progenitori neuroepiteliali localizzati nella zona più apicale.

Si può dunque ipotizzare che l'interazione tra htt e aPKC osservata tramite saggi biochimici, possa effettivamente rivestire una funzione a livello dei progenitori neuroepiteliali, a livello dei quali potrebbe ricoprire un ruolo nel coadiuvare i segnali associati al *pathway* di polarità per il corretto mantenimento delle loro proprietà proliferative.

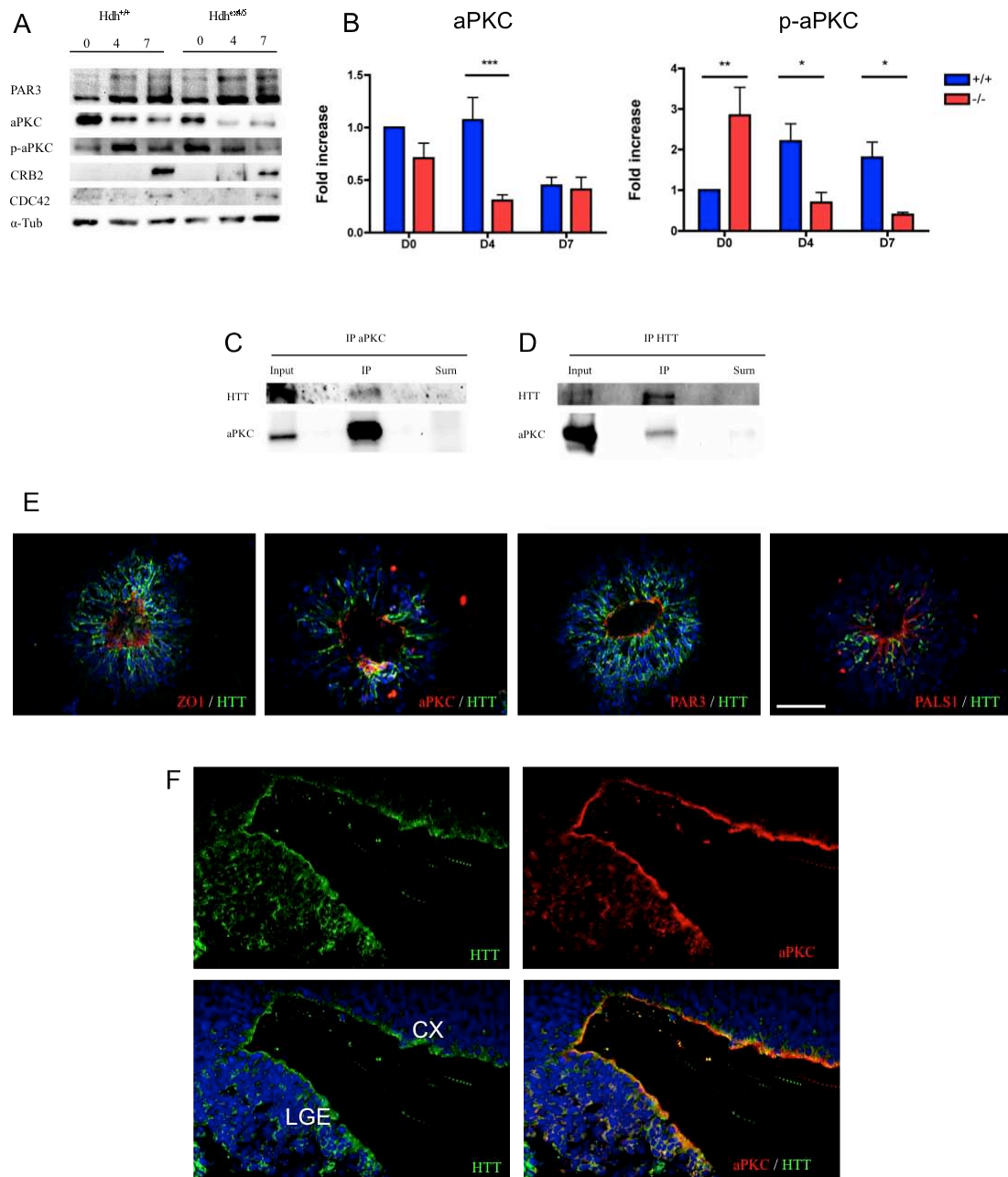


Figura 3.4 L'htt stabilizza i livelli proteici di aPKC tramite interazione diretta. (A) Analisi di Western Blot per le proteine di polarità apicale PAR3, aPKC, p-aPKC, CRB2 e CDC42.  $\alpha$ -Tubulina è stata utilizzata come normalizzatore interno. (B) Analisi densitometrica dei livelli di aPKC e della sua forma fosforilata. I dati sono stati ottenuti da 5 analisi effettuati su lisati proteici raccolti da almeno 3

esperimenti indipendenti. (C-D) Saggio di immunoprecipitazione su lisato raccolto al DIV 7 per aPKC (C) e htt (D). I filtri sono stati analizzati usando anticorpi anti aPKC e anti htt. (E) Analisi tramite microscopia confocale di rosette neurali marcate con anticorpi anti htt, ZO-1, aPKC, PAR3 e PALS1. (F) Sezioni di cervelli murini corrispondenti all'età gestazionale E12.5; l'area selezionata permette di riconoscere il ventricolo cerebrale, la corteccia (CX) e la *lateral ganglionic eminence* (LGE).

#### 1.4 Il segnale di WNT è alterato durante il differenziamento neurale di cellule

**Hdh<sup>ex4-5</sup>**

Il segnale di WNT svolge un ruolo fondamentale nei processi che regolano il bilanciamento tra proliferazione e differenziamento dei progenitori neuroepiteliali durante le fasi precoci dello sviluppo neurale, così come ha un'importanza critica nei processi di polarizzazione epiteliale (Hur and Zhou, 2010; Kim and Snider, 2011; Freese et al., 2010). GSK3 è il regolatore fondamentale della via del segnale di WNT (Kim et al., 2009b). Quando il segnale di WNT è acceso, GSK3 viene inattivato tramite fosforilazione. Ciò permette la stabilizzazione dei livelli di  $\beta$ -catenina (l'effettore finale del segnale a livello delle sequenze regolatorie TCF) che in questo modo è in grado di esercitare la propria azione nel nucleo. Alterazioni nella fine regolazione di GSK3 comportano una mancata coordinazione tra proliferazione e differenziamento dei progenitori neurali durante lo sviluppo del cervello (Kim et al., 2009b).

Inoltre, è molto rilevante ricordare che GSK3 è stato identificato come un importante *target* a valle del segnale di CDC42. Il lavoro fondamentale di Etienne-Manneville e Hall nel 2003 ha infatti dimostrato come GSK3 rappresenti un bersaglio diretto di aPKC, e come la sua fosforilazione sia strettamente dipendente dalla formazione e attivazione del complesso CDC42-PAR6-aPKC. Quando i livelli di CDC42 vengono ridotti, si assiste ad una riduzione dell'attività chinasi di aPKC e di conseguenza una ridotta fosforilazione di GSK3 (Etienne-Manneville and Hall, 2003). Ciò comporta un'alterazione del segnale di WNT e concomitanti difetti di polarizzazione cellulare.

Sulla base di queste evidenze, considerando che i dati riportati nel capitolo precedente indicano una diminuzione dei livelli di aPKC e soprattutto della sua forma attiva fosforilata nella linea Hdh<sup>ex4-5</sup>, si è voluto analizzare se ciò potesse poi comportare una successiva alterazione e riduzione della via del segnale di WNT. Questo comportamento sarebbe infatti in accordo con quanto osservato nella condizione di deplezione di htt cioè (i) un'alterazione del controllo del bilanciamento tra proliferazione e differenziamento dei progenitori neurali e (ii) problemi di polarizzazione cellulare che portano alla generazione di rosette neurali caratterizzate da una citoarchitettura irregolare.

Con questo fine, sono stati nuovamente raccolti lisati proteici ai giorno 4 e 7 del differenziamento neurale delle linee cellulari Hdh<sup>+/+</sup> e Hdh<sup>ex4-5</sup>. Sono stati analizzati i livelli di GSK3 e di  $\beta$ -catenina e delle rispettive forme fosforilate. Ciò che è stato



osservato è perfettamente in linea con le nostre premesse. Durante il normale differenziamento di cellule  $Hdh^{+/+}$ , GSK3 viene fosforilato e ciò permette l'accumulo di  $\beta$ -catenina nel nucleo. Nella linea  $Hdh^{ex4-5}$ , invece, la fosforilazione di GSK3 è molto ridotta a causa della bassa attività di aPKC: ciò comporta la fosforilazione di  $\beta$ -catenina con sua successiva degradazione al proteasoma (Fig. 3.5A e B).

Questo dato permette di validare ulteriormente il collegamento tra *htt* e polarità. L'*htt* infatti potrebbe interagire con aPKC, stabilizzando i suoi livelli e permettendo l'azione della normale via del segnale di WNT. In assenza di *htt*, aPKC non viene stabilizzata, comportando una ridotta attività del complesso regolatore CDC42-PAR6-aPKC nei confronti di GSK3.

Questo importante risultato è inoltre in linea con quanto riportato dal gruppo di Brakebusch (da cui abbiamo ottenuto la linea  $CDC42^{-/-}$ ) nel 2007: differenziando le cellule  $CDC42^{-/-}$  si assiste ad una ridotta attività di aPKC, che provoca proprio una minore fosforilazione di GSK3 (Wu et al., 2007).

Perciò, considerando l'insieme dei dati, è possibile concludere che l'*htt*, interagendo direttamente con aPKC, ne stabilizza i livelli e l'attività permettendo il normale controllo sulla fosforilazione di GSK3. Ciò comporta un fine bilanciamento della proliferazione neuroepiteliale e una corretta polarizzazione cellulare.

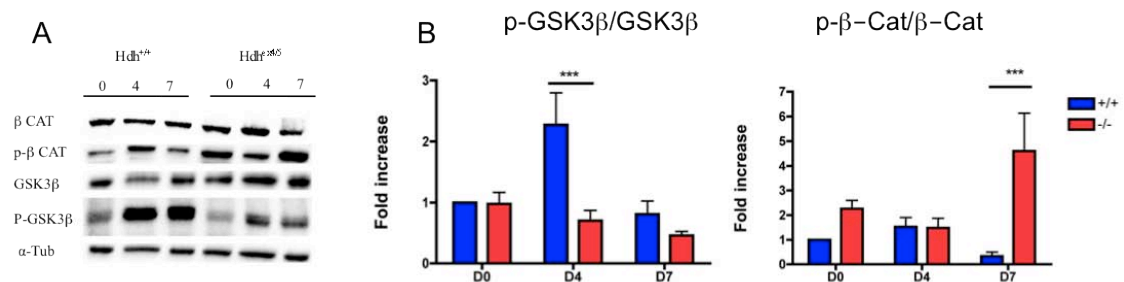


Figura 3.5 L'assenza di *htt* comporta difetti nel segnale di WNT. (A) Analisi di Western Blot per le proteine chiave della via del segnale di WNT  $\beta$ -catenina e GSK3 e delle rispettive forme fosforilate.  $\alpha$ -Tubulina è stata utilizzata come normalizzatore interno. (B) Analisi densitometrica dei livelli di  $\beta$ -catenina e GSK3 fosforilati, rapportati sui rispettivi livelli di proteina totale. I dati sono stati ottenuti da 5 analisi effettuate su lisati proteici raccolti da almeno 3 esperimenti indipendenti.

### **1.5 La reversione del fenotipo *rosetteless* nelle linee complementate con CDC42 e CRB2 è associata ad un sostanziale recupero dei corretti livelli di aPKC e della riattivazione della via del segnale di WNT**

I risultati fin'ora riportati hanno permesso di comprendere in maniera più approfondita i meccanismi che causano l'alterazione fenotipica *rosetteless* a carico della linea  $Hdh^{ex4-5}$ . Se già in parte una spiegazione risiede sull'eccessivo taglio da parte della proteasi ADAM10 a carico di N-Caderina (Lo Sardo et al., 2012), in questo progetto di Tesi sono state evidenziate ulteriori alterazioni a livello dei meccanismi di polarizzazione cellulare che, come è stato osservato, coinvolgono sia il controllo del destino dei progenitori neurali, che alterazioni dei livelli di aPKC. Tutto ciò si riflette poi sulla riduzione della fosforilazione di GSK3 e sulla via del segnale di WNT.

Gli studi sulla reversione del fenotipo *rosetteless* nelle linee cellulari  $Hdh^{ex4-5}$ pCDC42 e  $Hdh^{ex4-5}$ pCRB2 hanno contribuito a rafforzare notevolmente la nostra ipotesi iniziale di una connessione tra l'htt e la polarità cellulare.

In questo paragrafo mostriamo i risultati ottenuti da esperimenti effettuati su queste due linee cellulari durante l'indagine volta a comprendere se al recupero del corretto processo di neurulazione è anche associato un ripristino a livello biochimico dei livelli di aPKC (e della sua forma attiva) e della via del segnale di WNT.

A tal fine, sono state nuovamente differenziate le due linee cellulari complementate  $Hdh^{ex4-5}$ pCDC42 e  $Hdh^{ex4-5}$ pCRB2 e sono stati raccolti lisati proteici al DIV 4 e 7. Come prima cosa, sono stati analizzati tramite Western Blot i livelli di aPKC, paragonandoli a quelli osservati nella linea cellulare controllo. E' molto interessante osservare come, specialmente al DIV 4 (il *time point* che mostra maggiori differenze durante il differenziamento di cellule WT e KO), le alterazioni a carico di aPKC siano completamente annullate (Fig 3.6A e B). Un comportamento analogo è stato osservato anche analizzando i livelli di GSK3,  $\beta$ -catenina e delle rispettive forme fosforilate. Dalla Fig. 3.6C e D, infatti, si evince che i difetti a carico della via del segnale di WNT sono totalmente soppressi. Ciò è atteso ed è in linea con la nostra ipotesi precedentemente esposta, secondo cui aPKC è direttamente coinvolto nella regolazione dell'attività di GSK3.

Nella sezione della discussione verrò esposta in dettaglio la nostra ipotesi secondo la quale CDC42 e CRB2 sono in grado di agire sui livelli di aPKC e GSK3, permettendo

di ristabilire una condizione biochimica simile alle cellule controllo, oltre che di revertire il fenotipo *rosetteless*.

Come ultima analisi è stato analizzato il ciclo cellulare del linee Hdh<sup>ex4-5</sup>pCDC42 e Hdh<sup>ex4-5</sup>pCRB2 ai giorni 3-5-7 del differenziamento, come già fatto per la linee cellulari Hdh<sup>+/+</sup> e Hdh<sup>ex4-5</sup>. Anche in questo caso l'andamento è tornato paragonabile a quello di una linea cellulare controllo (Fig. 3.6E).

L'insieme di questi dati suggerisce che la reversione del fenotipo osservata è attribuibile ad un completo e funzionale ristabilimento del processo neurogenico e del bilanciamento tra proliferazione e differenziamento dei progenitori neurali.

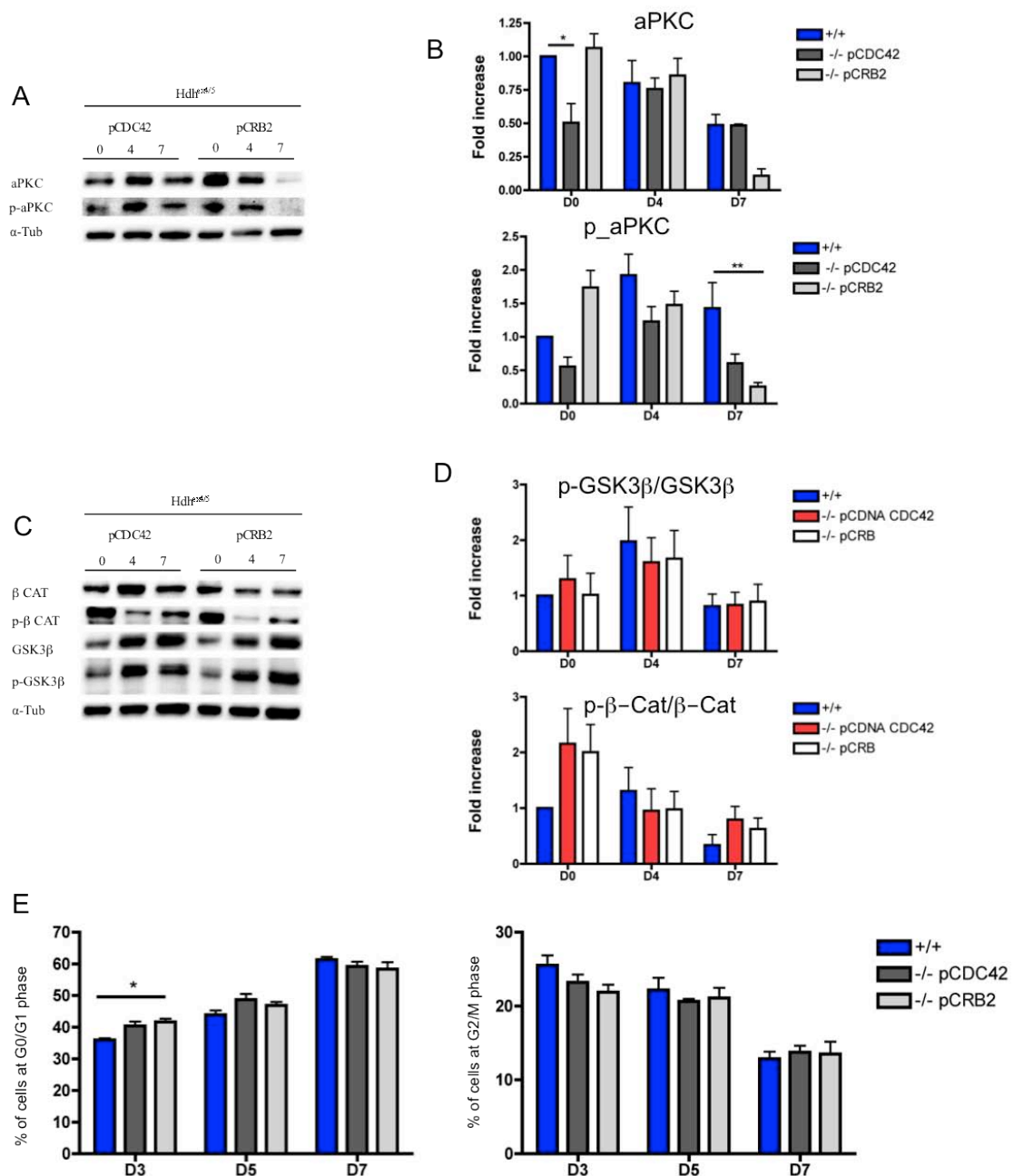


Figura 3.6 Analisi biochimica e del ciclo cellulare sulle linee Hdh<sup>ex4-5</sup>pCDC42 e Hdh<sup>ex4-5</sup>pCRB2. (A) Analisi di Western Blot per le proteine di polarità apicale aPKC, p-aPKC.  $\alpha$ -Tubulina è stata utilizzata come normalizzatore interno. (B) Analisi densitometrica dei livelli di aPKC e della sua forma fosforilata. I dati sono stati ottenuti da 5 analisi effettuate su lisati proteici raccolti da almeno 3 esperimenti indipendenti. (C) Analisi di Western Blot per le proteine chiave della via del segnale di WNT  $\beta$ -catenina e GSK3 e delle rispettive forme fosforilate.  $\alpha$ -Tubulina è stata utilizzata come normalizzatore interno. (D) Analisi densitometrica dei livelli di  $\beta$ -catenina e GSK3 fosforilati, rapportati sui rispettivi livelli di proteina totale. I dati sono stati ottenuti da 5 analisi effettuati su lisati proteici raccolti da almeno 3 esperimenti indipendenti. (E) Analisi del ciclo cellulare tramite saggio del propidio ioduro ed analisi citofluorimetrica. Sono stati analizzati 4 esperimenti indipendenti di differenziamento per ogni linea cellulare.

## **Parte 2**

**Descrizione di un modello malattia, attraverso la generazione di cellule iPS da pazienti affetti da HD**

## 2.1 Generazione di cellule iPS da fibroblasti derivati da pazienti HD

Il protocollo di differenziamento diretto di cellule pluripotenti umane verso neuroni (descritto in questo lavoro di Tesi nel capitolo introduzione), rappresenta un valido strumento per la generazione *in vitro* di un modello per l'HD. Al fine di studiare infatti, i meccanismi patogenetici dell'HD è indispensabile analizzare una popolazione cellulare arricchita della componente neuronale, quella che selettivamente va incontro a degenerazione durante il concludersi della malattia.

A questo scopo, sono state derivate diverse linee di cellule iPS umane a partire da fibroblasti derivati da tre pazienti affetti da HD, denominati HD509, HD832, e HD1657, ottenuti grazie alla collaborazione con l'Istituto Neurologico "C. Besta" di Milano. Le prime due linee cellulari derivano da rari pazienti omozigoti per la mutazione, con un'espansione del tratto CAG rispettivamente di 42/44 CAG e 39/42 CAG. La linea cellulare eterozigote per la mutazione possiede invece 17 ripetizioni sull'allele sano e 45 su quello mutato. In parallelo, sono state derivate due diverse linee di cellule iPS da fibroblasti adulti *wild type* (WT) con 15/17 CAG e da fibroblasti neonatali WT con 15/18 CAG (Tabella 2.1). Come metodi di riprogrammazione sono stati utilizzati due diversi lentivirus policistronici. In un primo *round* di infezione, i fibroblasti sono stati trasdotti con un singolo vettore lentivirale policistronico codificante per i quattro geni *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, e *C-MYC* (4F). In un secondo *round*, invece è stato utilizzato un altro vettore lentivirale policistronico, codificante solo per i tre fattori *OCT4*, *SOX2*, e *KLF4* (3F), prodotto in collaborazione con il gruppo del Prof. Naldini dell'Istituto S. Raffaele. Come valore di *multiplicity of infection* (MOI) (numero di particelle virali/cellula) abbiamo utilizzato 1.66, un valore che rappresenta un buon compromesso tra l'espressione dei transgeni, vitalità cellulare e mantenimento dell'integrità genomica. Dopo 5 giorni dall'infezione, sono state osservate tramite IF l'espressione delle proteine OCT4 e SOX2 nei fibroblasti, indice di una corretta espressione dei transgeni (Fig. 4.1A). Circa il 75% delle cellule è risultato essere positivo per questi 2 marcatori di pluripotenenza.

Tabella 4.1

Fibroblast lines	Haplotype <sup>a</sup>	Age	Reprogramming factors	iPS lines
HD509	42/44	59	OKSM <sup>b</sup> (lentivirus)	HD-iPS <sup>hom</sup> 4F-1
			OKSM (lentivirus)	HD-iPS <sup>hom</sup> 4F-2
			OKS (lentivirus)	HD-iPS <sup>hom</sup> 3F-1
			OKS (lentivirus)	HD-iPS <sup>hom</sup> 3F-2
HD832	39/43	44	OKSM (lentivirus)	HD-iPS <sup>hom</sup> 4F-3
HD1657	17/45	36	OKS (lentivirus)	HD-iPS <sup>het</sup> 3F-1
Dermal fibroblasts	15/17	36	OKS (retrovirus)	WT-iPS 3F-1
Foreskin fibroblasts	15/18	Newborn	OKSM (lentivirus)	WT-iPS 4F-1

<sup>a</sup> L'aplotipo indica il numero delle ripetizioni del tratto CAG su ciascun allele

<sup>b</sup> OKSM: *OCT4* (O), *KLF4* (K), *SOX2* (S), *C-MYC* (M)

Tabella 2.1. Linee cellulari di fibroblasti riprogrammati e nomenclatura dei cloni generati.

L'infezione con 4F ha mostrato un'efficienza di riprogrammazione pari allo 0.011% (17 colonie ottenute da  $15 \times 10^4$  fibroblasti infettati). Dopo circa 35 giorni dall'infezione, sono state selezionate colonie con una morfologia simile a quella delle cellule hES, che sono state amplificate e propagate sia su *feeder layer* di fibroblasti umani neonatali (*foreskin*) che su MEFs (Fig. 4.1B, sono mostrati tre cloni rappresentativi di tutti quelli generati). L'efficienza di riprogrammazione utilizzando 3F, in mancanza di *C-MYC*, è stata molto più bassa; si sono generate solo poche colonie (3-5) con un tempo di comparsa molto più lungo (circa tre settimane in più). Questo è in accordo coi dati presenti in letteratura che conferiscono a C-MYC un ruolo attivo nel garantire un'alta efficienza di riprogrammazione, a scapito però del maggior rischio di sviluppare over-proliferazione non controllata. Alla luce dei due diversi esperimenti è comunque possibile concludere che la mancanza di HTT nelle cellule portatrici della mutazione in omozigosi, non inficia il processo di riprogrammazione. Sono stati espansi e portati avanti indipendentemente 3 cloni per ogni linea di fibroblasti riprogrammati.

Per i successivi esperimenti, sono stati selezionati in modo casuale tre cloni riprogrammati con 4F dalla linea HD509 (HD-iPS<sup>hom</sup> 4F-1, HD-iPS<sup>hom</sup> 4F-2 e HD-iPS<sup>hom</sup> 4F-3), e due cloni riprogrammati con 3F dai fibroblasti HD509 (HD-iPS<sup>hom</sup> 3F-1 e HD-iPS<sup>hom</sup> 3F-2; Tabella 4.1). Sono stati inclusi nell'analisi anche un clone derivante

dalla linea portatrice della mutazione in eterozigosi HD1657 (HD-iPS<sup>het</sup> 3F-1), e due derivanti da linee di fibroblasti WT (WT-iPS 4F-1 e WT-iPS 3F-1). Tutti i cloni sono risultati positivi per i marcatori di pluripotenza, Nanog e TRA1-81 (Fig. 4.1B sono mostrati tre cloni rappresentativi di tutti quelli generati). OCT4 non è stato valutato, in quanto è uno tra i geni utilizzati per la riprogrammazione.

Analisi di PCR quantitativa hanno evidenziato come il vettore di riprogrammazione si sia efficacemente silenziato dopo la selezione dei cloni iPS. Le analisi sono state effettuate su due cloni rappresentativi (HD-iPS<sup>hom</sup> 3F-1 e HD-iPS<sup>hom</sup> 3F-2). Queste hanno mostrato come l'espressione dei trascritti dei transgeni del vettore (OKS) si sia ridotta fino ai livelli non rilevabili, se comparata con i livelli presenti nei fibroblasti 10 giorni dopo l'infezione, in cui il promotore lentivirale è ancora molto attivo (Fig. 4.1C). In particolare, mentre i geni esogeni della riprogrammazione sono quasi completamente silenziati (fino a 250 volte di riduzione dell'espressione), OCT4 endogeno è fortemente espresso; ciò conferma una forte riattivazione della *machinery* trascrizionale endogena del programma di pluripotenza.



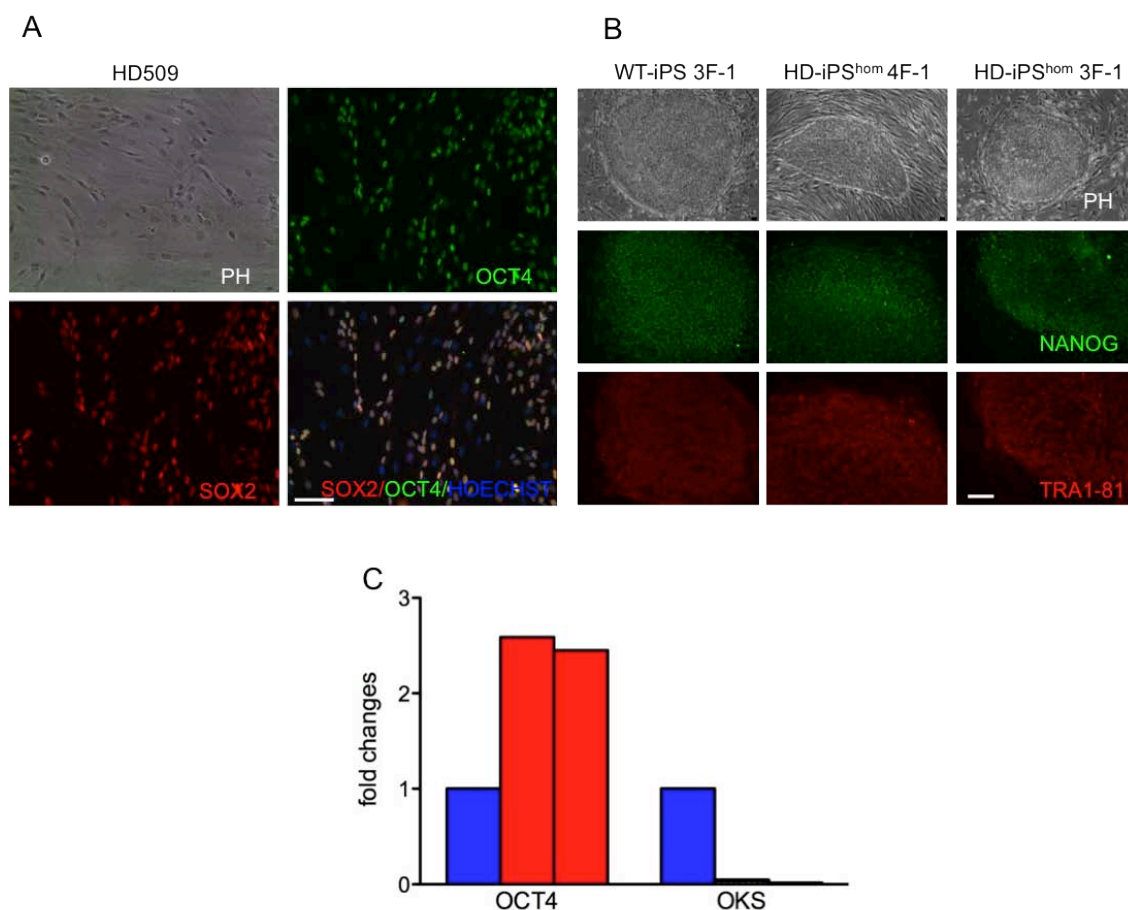


Figura 4.1. Caratterizzazione delle linee iPS generate in *self-renewal*.

(A) Immagine in contrasto di fase della morfologia dei fibroblasti HD509 infettati. L'analisi di immunofluorescenza mostra l'espressione dei fattori di riprogrammazione OCT4 e SOX2. (B) L'immagine in contrasto di fase mostra una morfologia simile a quelle delle cellule hES; immunofluorescenza per i marcatori di pluripotenza Nanog e TRA1-81. (C) L'istogramma mostra il *fold change* dei livelli di espressione del trascritto di *OCT4* derivato dal vettore OKS, in due cloni rappresentativi di iPS (colonne rosse), relativo ai fibroblasti trasdotti (colonne blu). Per la normalizzazione è stato usato il gene *HPRT*.

Per verificare le proprietà di pluripotenza dei cloni di iPS generati è stato effettuato il saggio di formazione di EBs sulle cellule WT-iPS 3F-1, HD-iPS<sup>het</sup> 3F-1 e HD-iPS<sup>hom</sup>. Dopo 15 giorni *in vitro*, gli EBs hanno generato cellule positive per i marcatori tipici dei tre foglietti germinativi  $\beta$ III-Tubulina,  $\alpha$ -SMA, e GATA 4 (rispettivamente ectoderma, mesoderma ed endoderma) (Fig. 4.2A). Un criterio operativo ancora più definitivo per valutare la pluripotenza è il saggio di formazione del teratoma, a questo scopo, in collaborazione con il gruppo della Prof.ssa Hovatta del Karolinska Institute, cloni di cellule iPS sono stati iniettati in topi immunodepressi. In ogni animale sono stati riscontrati segni di teratoma, contenenti componenti di ectoderma, mesoderma, e

endoderma (Fig. 4.2B). Inoltre, sono state osservate tracce di tessuto del sacco vitellino, simili a quelle normalmente trovate *in vivo* nei tumori derivati da cellule germinali e nei teratomi. La natura di questo tessuto è stata evidenziata tramite analisi istochimica per i marcatori AFP e GPC3 (Zynger et al., 2010) (Fig. 4.2C). Sono state anche osservati aggregati cellulari, che ricordano nella struttura EBs, esprimenti OCT 3/4. Ciò indica un mantenimento del compartimento di cellule pluripotenti. La capacità osservata nei cloni di cellule iPS di generare tessuti del sacco vitellino non è stata osservata, ad oggi, in nessuna linea di ES trapiantata in animali SCID.

Successivamente, abbiamo verificato che l'infezione con lentivirus avesse comportato solo una o poche integrazioni nel genoma della cellula ospite, come atteso in base all'MOI usata. Come indice di analisi è stato utilizzato il *vector copy number per cell* (VCN), analizzato in due cloni rappresentativi generati utilizzando 3F. Come atteso, i cloni mostrano, una o due copie di virus per cellula (dati non mostrati).

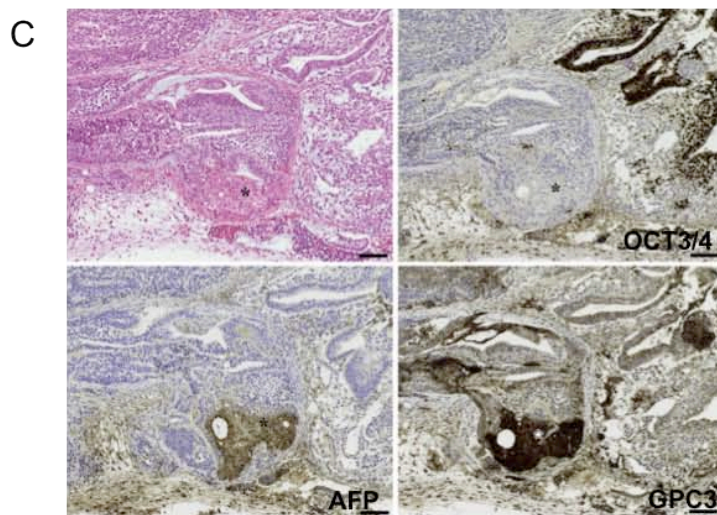
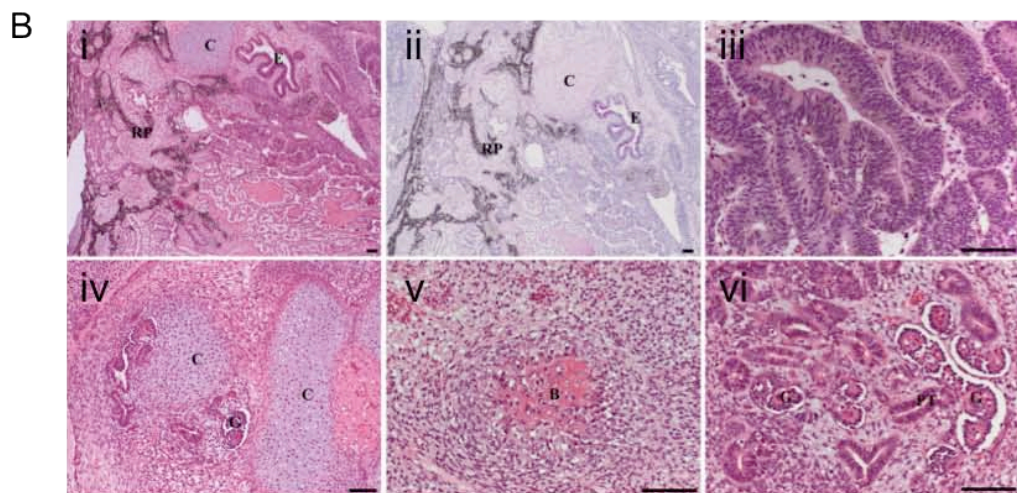
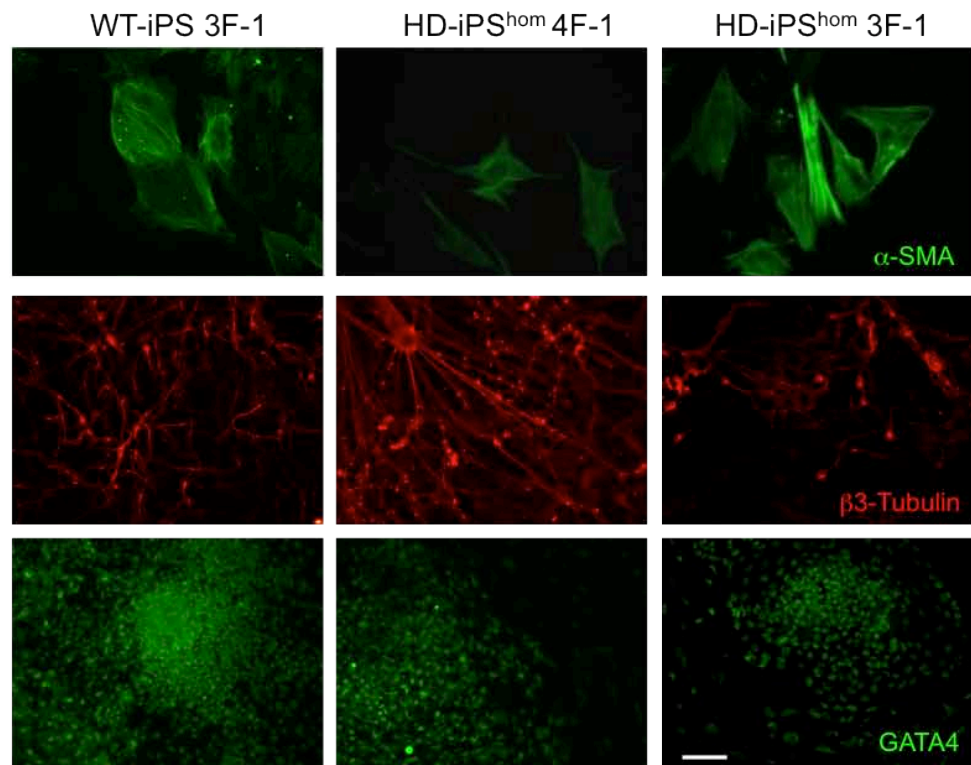


Figura 4.2. Valutazione dei criteri di pluripotenza *in vitro* ed *in vivo*.

(A) Le linee di cellule WT-iPS 3F-1, HD-iPS<sup>hom</sup> 4F- e HD-iPS<sup>hom</sup> 3F-1 sono state differenziate ad EBs. Dopo 15 giorni di differenziamento le cellule sono risultate positive per i marcatori del mesoderma ( $\alpha$ -SMA), ectoderma ( $\beta$ III-Tubulina), e endoderma (GATA4). (B) Le cellule sono state iniettate sottopelle in topi SCID all'età di 7 settimane. Le strutture tumorali sono state osservate in ogni topo iniettato con le linee HD-iPS<sup>hom</sup> 3F-1 e HD-iPS<sup>hom</sup> 3F-2. Tutti i campioni sono stati marcati con ematossilina e eosina, ad eccezione della ii, la quale è marcata con PAS-Diastase. i e ii mostrano una panoramica di un'area con una presenza prominente di strutture epiteliali pigmentate che ricordano l'epitelio pigmentato della retina (RP). Nell'immagine ii, la marcatura per PASD risalta un tubulo dell'endoderma (E) con una prevalenza di cellule di Golet. L'immagine iii mostra un maggiore ingrandimento dell'epitelio pigmentato della retina, con presenza di melanina citoplasmatica. (C) Nell'immagine iv si osserva la formazione di tessuto renale, indicato dalla presenza di glomeruli primitivi (G) circondati da cartilagine (C). Nell'immagine vi è rappresentato un ingrandimento maggiore della formazione del rene primitivo con i glomeruli circondati dalla capsula di Bowman parietale e viscerale. I tubuli prossimali (PT) si estendono dai glomeruli. Nell'immagine v si osserva una formazione primitiva di osso (B), apparentemente circondata da cellule mesenchimali. Barra = 100 micrometri. (C) I teratomi contengono strutture di sacco vitellino. Nell'immagine in alto a sinistra è presente differenziamento epatico (\*). Nell'angolo in alto a destra si osservano tubuli circondati da epitelio cilindrico (\*). Questa struttura rivela una forte reattività nucleare con anticorpi diretti contro OCT3/4. Cellule appartenenti al tessuto epatico sono positive per AFP e GPC3. Aree positive per OCT3/4 sono negative per GPC3 e *vice versa*. Barra = 100 micrometri.

## 2.2 La lunghezza della ripetizione del tratto CAG non interferisce con il processo di riprogrammazione, la proliferazione e il differenziamento delle cellule iPS

In letteratura è riportato che il tratto CAG overespresso nell'HTT, potrebbe andare incontro ad instabilità somatica in modelli malattia murini transgenici e in cervello di pazienti HD, soprattutto nello striato (Kennedy et al., 2003; Gonitell et al., 2008; Dragileva et al., 2009). È stato ipotizzato che la variazione cervello-specifica della lunghezza del tratto CAG, potrebbe modificare il processo patogenetico (Kennedy et al., 2003). Inoltre, è stato riportato in una linea di cellule hES portatrice del gene mutato HD, un'espansione (limitata) di 5 ripetizioni del tratto CAG dopo il differenziamento neuronale (Nielis et al., 2009), sebbene questo comportamento non sia stato poi osservato in altre linee (Seriola et al., 2011). Alla luce di queste evidenze, abbiamo verificato il comportamento del tratto CAG in fase di proliferazione (dopo la riprogrammazione) e dopo il differenziamento neuronale, in collaborazione con il gruppo della Dott.ssa Gellera dell'Istituto Neurologico "C. Besta" di Milano. Per questo tipo di analisi abbiamo effettuato un'elettroforesi capillare con *ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyzer*. In Tabella 4.2 è riportato che tutte le linee di cellule HD-iPS hanno mantenuto la stessa lunghezza del tratto CAG riscontrato nei fibroblasti di origine.

Fibroblast lines	iPS lines	Cell passage	Haplotype
HD509	HD-iPS <sup>hom</sup> 4F-1	20	42/44
	HD-iPS <sup>hom</sup> 4F-1	40	42/44
	HD-iPS <sup>hom</sup> 4F-2	12	42/44
	HD-iPS <sup>hom</sup> 3F-1	13	42/44
	HD-iPS <sup>hom</sup> 3F-2	13	42/44
HD832	HD-iPS <sup>hom</sup> 4F-3	46	39/43

Tabella 4.2. Analisi della lunghezza del CAG dopo il processo di riprogrammazione e durante i passaggi *in vitro*.

Inoltre, l'analisi del DNA del clone HD-iPS<sup>hom</sup> 4F-1 ha mostrato che il tratto CAG rimane stabile fino a 40 passaggi *in vitro*. (Fig. 4.3A e Tabella 4.2). Dopo 30 giorni dall'induzione del differenziamento neurale, le linee di cellule HD-iPS non hanno

mostrato espansione del tratto CAG. Al contrario, è stata occasionalmente misurata una contrazione delle ripetizioni della tripletta; ad esempio un aplotipo di 42/44 CAG ha perso due triplette CAG (Fig. 4.3B). Questi dati indicano come il tratto CAG nel gene umano rimane stabile durante i passaggi e dopo differenziamento neuronale.

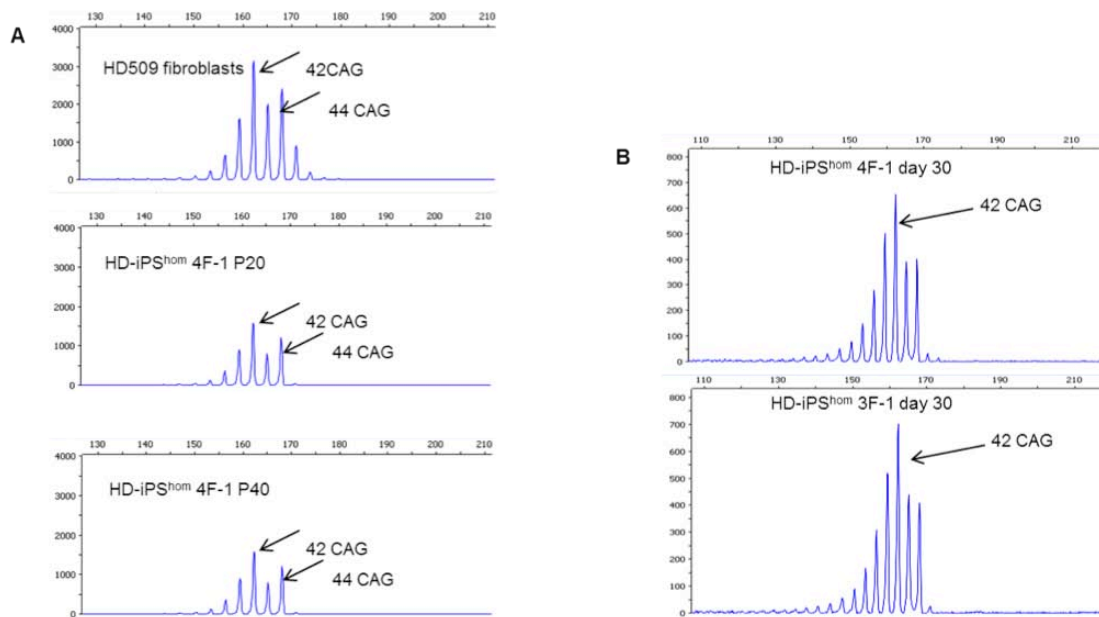


Figura. 4.3 Stabilità del tratto CAG in proliferazione ed in differenziamento in cellule iPS riprogrammate. (A) La stabilità del tratto CAG è stata analizzata in *self-renewal* nei fibroblasti d'origine (in alto), e dopo la riprogrammazione al passaggio 20 (P20) e al 40 (P40). Lo spettro capillare della lunghezza dei frammenti indica picchi prevalenti a 162 e 168 paia di basi, le quali corrispondono, rispettivamente, a 42 e 44 ripetizioni del CAG. (B) Al giorno 30 del differenziamento lo spettro capillare della lunghezza dei frammenti indica un picco prevalente a 162 paia di basi, che corrispondono 42 ripetizioni del tratto CAG.

### 2.3 Il differenziamento neurale di cellule HD-iPS è variabile, ma non influenzato dalla lunghezza del tratto CAG

Per verificare la capacità delle linee di cellule HD-iPS generate di differenziare verso il destino neuronale, è stato applicato il protocollo di differenziamento in monostrato descritto da Chambers e colleghi nel 2009 (Chambers et al., 2009). Al giorno 15 del differenziamento è stata monitorata l'espressione di PAX6, tipico marcatore di neuroectoderma, per verificare che tutte le linee fossero in grado di rispondere correttamente al protocollo di conversione neurale. Come mostrato in Fig. 4.4 sia i cloni di cellule WT che le linee di cellule HD-iPS sono positivi per Nestin e PAX6, con una tempistica simile a quella della linea di cellule hES H9 usata come controllo interno. Le diverse linee di cellule iPS hanno risposto in maniera comparabile al protocollo di differenziamento, in quanto circa il 20% delle cellule in tutte le linee ha mostrato espressione di PAX6 (Fig. 4.4A e B). Successivamente, abbiamo verificato la capacità di dare origine a neuroni maturi. I progenitori neurali generati sono stati ripiastrati e mantenuti in un *medium* contenente N2, B27 e BDNF. Al giorno 25 del differenziamento sono diventati visibili neuriti provenienti da *clusters* cellulari. Anche in questo stadio non sono risultate evidenti differenze nel tempo di comparsa dell'espressione di  $\beta$ III-Tubulina e MAP2 (Fig. 4.4A; la percentuale di cellule  $\beta$ III-Tubulina<sup>+</sup> è risultata intrinsecamente variabile tra le linee di cellule HD-iPS, variando dal 12%  $\pm$  1.20 al 34%  $\pm$  2.40 (Fig. 4.4A e C). Ciò non ci è risultato inaspettato, in quanto è stato già riportato come la capacità differenziativa sia intrinsecamente differente tra diverse linee di cellule ES e di iPS (Osafune et al., 2008; Kim et al., 2010a; Hu et al., 2010; Kim et al., 2011). Prolungando il differenziamento fino a 50 giorni, sia le cellule HD-iPS che le cellule WT-iPS hanno mostrato una quantità equivalente di cellule immunopositive per GABA (Fig. 4.4D).

I sottotipi neuronali maggiormente affetti nell'HD sono i neuroni striatali e corticali (Reiner et al., 1988). Tuttavia, le alterazioni dello sviluppo di questi tipi neuronali avvengono soprattutto durante la specificazione neuronale. Ad esempio, è stato descritto come neuroni striatali derivati dal modello murino di HD portatore di 111 ripetizioni del tratto CAG (HdhQ111 *mice*), esprimessero Nanog, SOX2 e Stat3. Questa espressione genica aberrante sembra rendere i neuroni più suscettibili alla patologia (Molero et al., 2009). Allo scopo di verificare se esistesse una grossolana alterazione dei programmi di sviluppo, le linee cellulari WT-iPS 3F-1 e HD-iPS<sup>hom</sup> 4F-1 sono state esposte ad un

protocollo di differenziamento cellulare per oltre 50 giorni. Ai giorni 0, 10 e 20 è stata analizzata l'espressione dell'mRNA di Nanog e di geni coinvolti nella specificazione anteriore, come SIX3 e FOXG1. L'analisi tramite RT-PCR (Fig. 4.4E) ha mostrato, come atteso, che l'mRNA di Nanog non viene osservato durante il differenziamento neuronale sia nelle linee di cellule WT che in quelle HD. D'altra parte, entrambe le linee cellulari esprimono SIX3 e FOXG1 dopo 20 giorni di differenziamento. Inoltre, al giorno 50 del differenziamento è stata verificata, tramite RT-PCR, la presenza di specifici marcatori GABAergici, come *GAD65/67*, e striatali come *ARPP-21* e *DARPP-32* (Fig. 4.4E). Non sono state riscontrate differenze significative tra le due linee, attribuibili alla diversa lunghezza del tratto CAG. Questo ci permette di concludere che la mutazione dell'HD in questo modello *in vitro* probabilmente non inficia il differenziamento e la specificazione del destino neuronale anteriore.



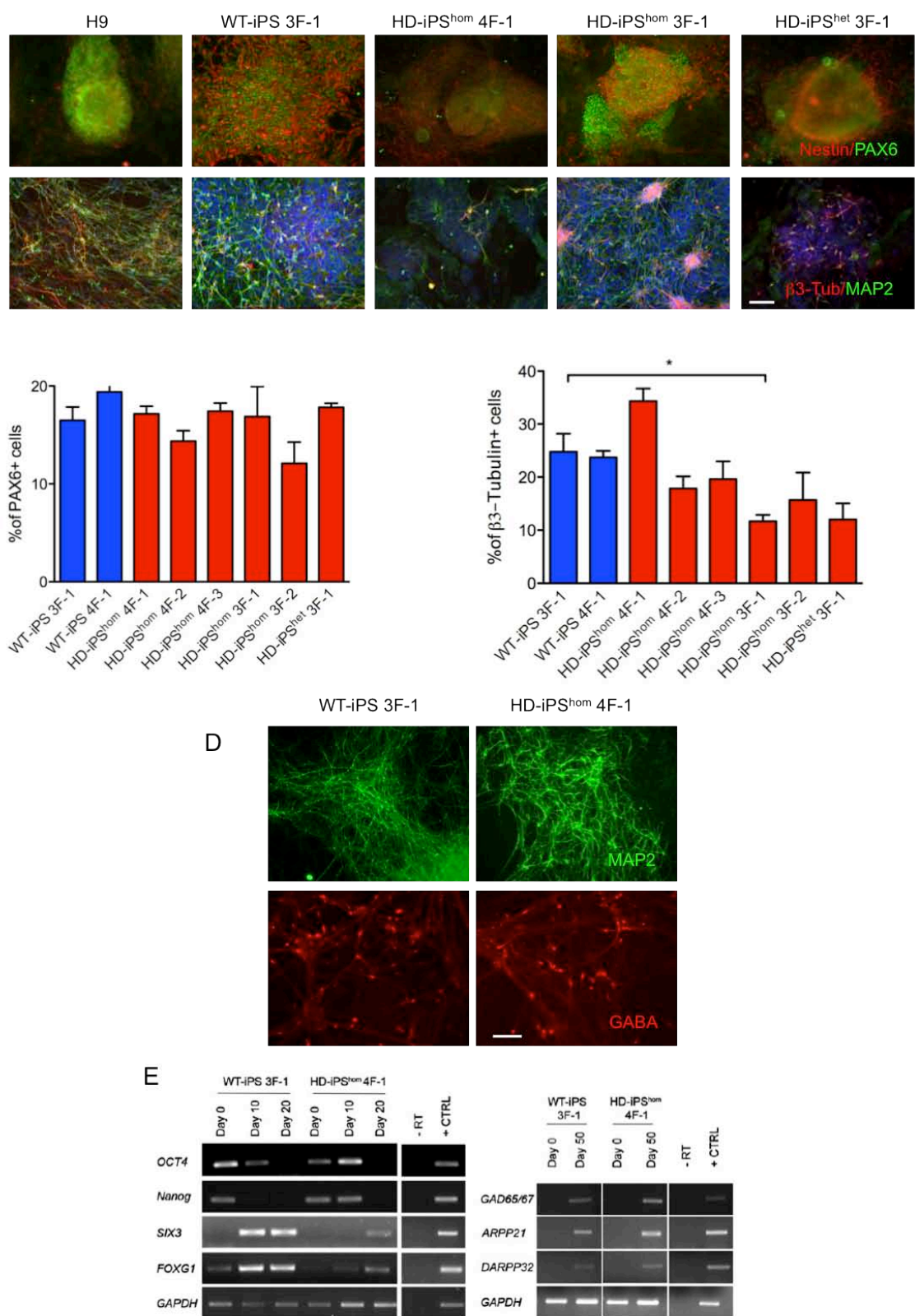


Figura 4.4. Linee di cellule iPS HD e WT differenziano verso neuroni maturi con identità anteriore.

(A) Al giorno 15 del differenziamento si formano rosette neurali positive per PAX6 (verde) e Nestin (rosso). Sono state testate tutte le linee di cellule iPS generate (sia WT che HD) e comparate con la linea di cellule hES H9, usata come controllo interno. E' mostrato un clone per ogni linea di cellule iPS

derivata. Dopo 30 giorni di differenziamento, i neuroni generati esprimono  $\beta$ III-Tubulina (verde) e MAP2 (rosso). (B) La percentuale delle cellule PAX6<sup>+</sup> è stata calcolata contando tre campi di cellule/clone. Test statistici usati: *one-way ANOVA* seguito dal *Dunnet post hoc test*. (C) La percentuale delle cellule  $\beta$ III-Tubulina<sup>+</sup> è stata calcolata contando tre campi di cellule/clone. Test statistici usati: *one-way ANOVA* seguito dal *Dunnet post hoc test*. \*p<0.05. (D) Prolungando il differenziamento fino al giorno 50 in un *medium* addizionato con supplementi e neurotrofine, sia le cellule WT-iPS che le cellule HD-iPS<sup>hom</sup> 4F-1 sono risultate positive per GABA. (E) Analisi di RT-PCR eseguite durante la fase di induzione neurale mostrano cambiamenti, dopo 0, 10 e 20 giorni, nell'espressione dell'mRNA dei geni *Nanog*, *SIX3* e *FOXG1*. E' stato usato il gene *GAPDH* per normalizzare i livelli di espressione. Dopo 55 giorni di differenziamento, i neuroni terminalmente differenziati esprimono marcatori GABAergici e striatali.

## 2.4 Validazione di fenotipi associati alla malattia, in cellule HD-iPS

Allo scopo di validare il possibile uso di cellule iPS come modello malattia, sono stati analizzati specifici *readouts* molecolari implicati nella patogenesi della malattia, descritti in modelli animali e cellulari.

Come prima analisi, sono stati considerati i processi cellulari di proliferazione, morte ed espansione lisosomiale. L'attività di proliferazione e di apoptosi è stata analizzata in condizione di *self-renewal* tramite immunofluorescenza. In particolare, è stato utilizzato il pPH3 che, ricordiamo, identifica cellule nella fase di mitosi, e la Caspasi 3 attivata, che invece marca le cellule in apoptosi. La Fig. 4.5A mostra l'assenza di differenze significative nel *rate* di proliferazione, come indicato dalla percentuale di cellule positive per pPH3, tra le linee di cellule WT e HD-iPS. In particolare, il numero di cellule positive per pPH3 ha mostrato che circa il 5% della popolazione controllo è in fase M del ciclo cellulare, e ciò non è stato alterato dalla mutazione HD, in quanto la linea di cellule HD-iPS si comporta in modo analogo (Fig. 4.5A e B). Lo stesso comportamento è stato osservato in tutte le linee di cellule HD-iPS (dato non mostrato). Successivamente è stata valutata l'apoptosi tramite la conta di cellule immunoreattive per la Caspasi 3 attivata; non sono state riscontrate differenze nel comportamento tra linee con diversi genotipi, suggerendo che la presenza della mutazione non è sufficiente ad attivare il programma di morte cellulare (Fig. 4.5A).

In letteratura è stata descritta la presenza di aggregati di HTT mutata nei neuroni cerebrali *post-mortem* e in diversi modelli animale (Zuccato et al., 2010). Inoltre, è stata evidenziata, in colture di cellule di mammifero, una forte correlazione tra gli aggregati di HTT e la suscettibilità alla morte cellulare (Zuccato et al., 2010). D'altra parte, un set indipendente di dati dimostra come gli aggregati di HTT abbiano una funzione neuroprotettiva, in quanto agiscono stimolando il processo autofagico e aumentando la *clearance* dell'HTT mutata (Ravikumar and Rubinsztein, 2006). Nelle cellule di mammifero sono attivi due *pathways* principali deputati alla *clearance* proteica: il *pathway* del proteasoma-Ubiquitina e quello dell'autofagia e dei lisosomi. In neuroni derivati da tessuto cerebrale *post-mortem* di pazienti HD e in modelli cellulari della patologia, è stato descritto un aumento delle strutture autofagosoma-simili (Davies et al., 1997; Ravikumar et al., 2004; Sapp et al., 1997).

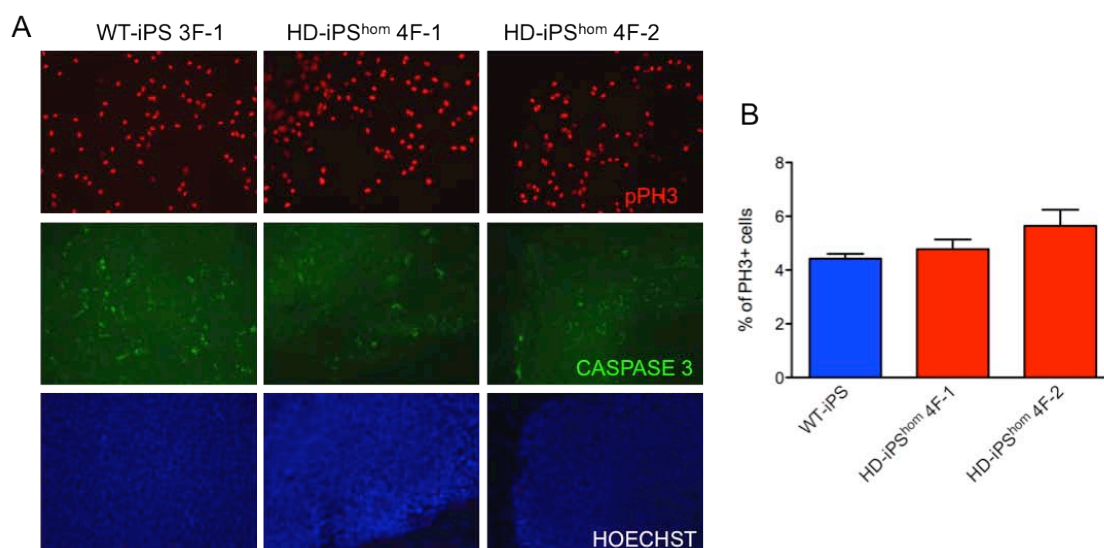


Figura 4.5 Le linee di cellule HD-iPS non mostrano differenze nella proliferazione e nell'apoptosi rispetto ai controlli. (A) Le linee di cellule iPS analizzate in *self-renewal* sono: WT-iPS 3F-1, HD-iPS<sup>hom</sup> 4F-1, e HD-iPS<sup>hom</sup> 4F-2. Non sono risultate evidenti differenze tra le diverse linee sia nel *rate* di proliferazione, che nell'attività della caspasi 3 attivata (intensità del segnale: WT-iPS 3F-1:  $30.4 \pm 4.1$ ; HD-iPS<sup>hom</sup> 4F-1:  $21 \pm 4.1$ ; e HD-iPS<sup>hom</sup> 4F-2:  $20.7 \pm 1.8$ ). (B) Per la quantificazione sono stati analizzati quattro campi di cellule/clone. Le barre di errore mostrano l'errore standard della media (SEM) valutato tramite i test statistici dell'*one-way ANOVA* seguito dal *Dunnet post hoc test*.

Partendo da queste osservazioni, è stata analizzata la quantità di lisosomi presenti durante la fase di *self-renewal*. Per i diversi saggi è stato usato il LysoTracker® Red DND-99, un marcatore fluorescente che emette nel rosso, in grado di marcare, in cellule vive, i compartimenti acidi come i lisosomi. Le cellule WT-iPS 3F-1, HD-iPS<sup>hom</sup> 4F-1, e HD-iPS<sup>hom</sup> 4F-2 sono state esposte al LysoTracker per 30 minuti, successivamente sono state fissate, e le immagini acquisite sono state analizzate con il *software* ImageJ, per misurare l'intensità del segnale fluorescente nelle cellule positive. Come mostrato in Fig. 4.6A, il segnale fluorescente è molto brillante nelle cellule HD-iPS. Questi risultati suggeriscono che le linee di cellule HD-iPS presentano un numero di lisosomi maggiore rispetto alle linee controllo.

Per confermare questa osservazione, e per quantificare la differenza osservata, si è utilizzata la tecnica della citofluorimetria a flusso su cellule vive dopo marcatura con il LysoTracker. Per evidenziare maggiormente la risposta delle diverse linee di cellule iPS in termini di numero di lisosomi attivati, i cloni di cellule iPS omozigoti per la mutazione sono stati esposti al saccarosio per 48 ore, in grado di ingolfare il sistema dei lisosomi (Sardiello et al., 2009). L'analisi è stata eseguita ponendo la soglia del segnale

sul controllo isotipico. Ciò ha mostrato che la proporzione di cellule HD-iPS marcate supera di due volte quelle delle WT-iPS (Fig. 4.6B e C). Questa analisi suggerisce che le cellule HD-iPS sono molto suscettibili agli agenti stressanti.

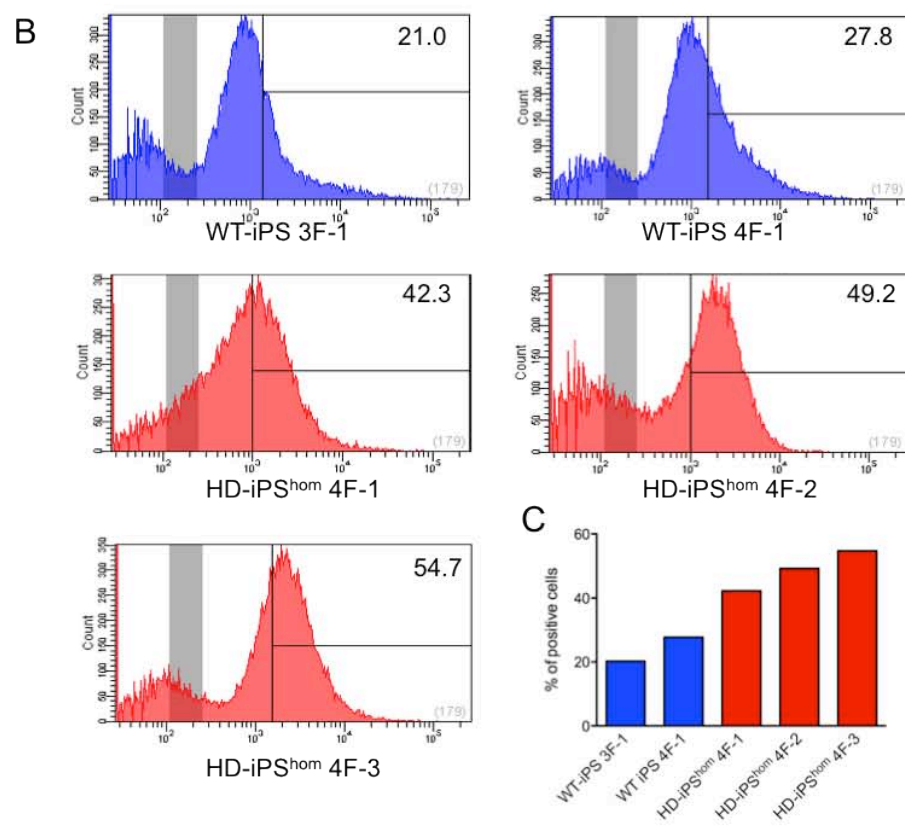
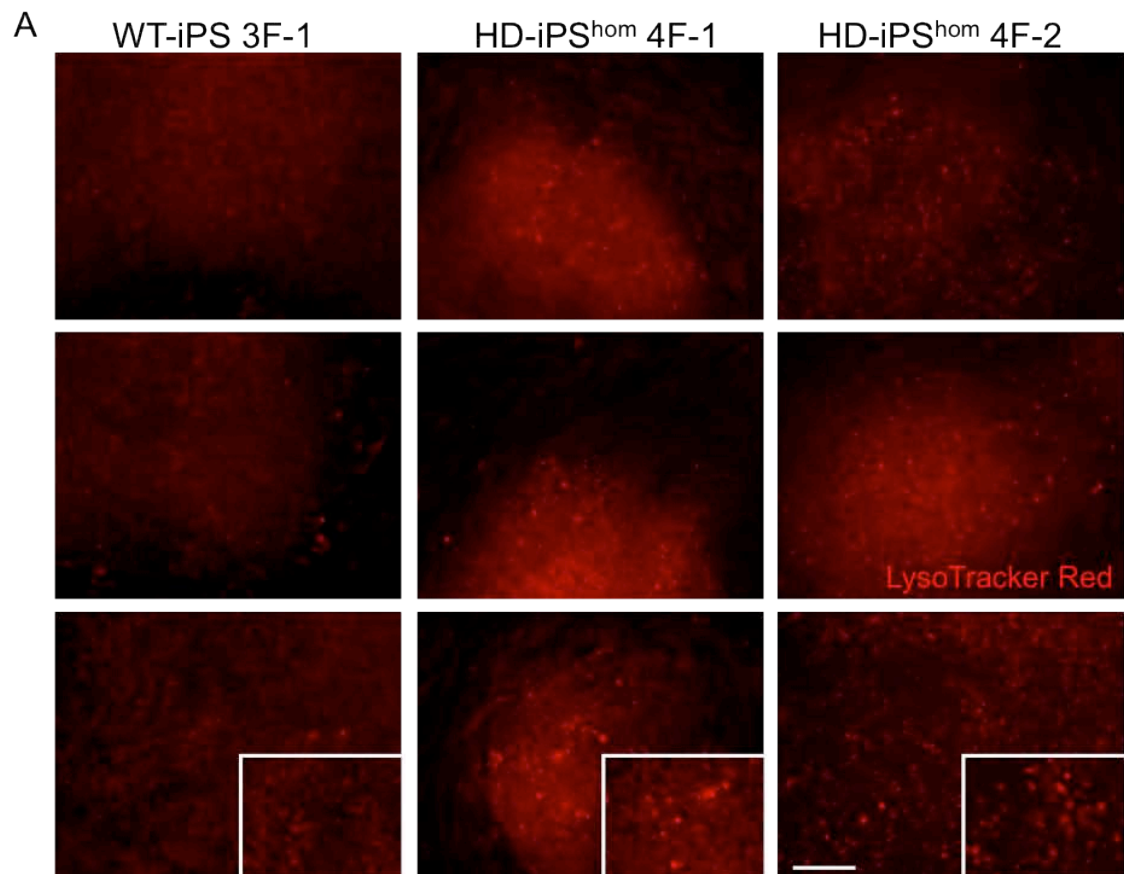


Figura 4.6. Le linee di cellule HD-iPS in condizione di *self-renewal* mostrano un aumento del numero di lisosomi. (A) Sono mostrate tre colonie rappresentative per ogni clone di cellule iPS analizzato con LysoTracker. I riquadri mostrano un maggiore ingrandimento della parte centrale delle colonie. Barra = 100 micrometri. (B e C) Analisi di citofluorimetria effettuata su cellule vive dopo lo *staining* con LysoTracker e l'esposizione al saccarosio per 48 ore. Sono state analizzate  $2 \times 10^4$  cellule/linea; la soglia è stata regolata sul segnale del controllo isotipico.

Lo stesso esperimento è stato ripetuto sulle cellule WT-iPS e HD-iPS<sup>hom</sup> 4F-1 sottoposte al protocollo di differenziamento neurale. L'analisi è stata estesa a cellule differenziate per 25 giorni, in modo da valutare l'attività lisosomiale in neuroni maturi (Fig. 4.7A). E' risultato evidente che, dopo il trattamento con saccarosio, il valore assoluto dell'intensità di fluorescenza del segnale era più alto in tutte le linee di cellule differenziate, rispetto alle linee controllo (Fig. 4.7B e C). In questa analisi è stato fissato un secondo valore soglia sull'intensità di fluorescenza di  $10^4$ . Anche in questo caso, le cellule HD-iPS hanno mostrato una percentuale di cellule positive al LysoTracker maggiore rispetto alle linee controllo (Fig. 4.7B e C).



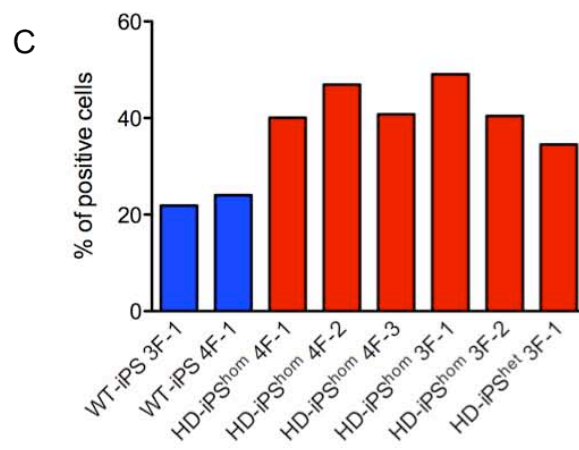
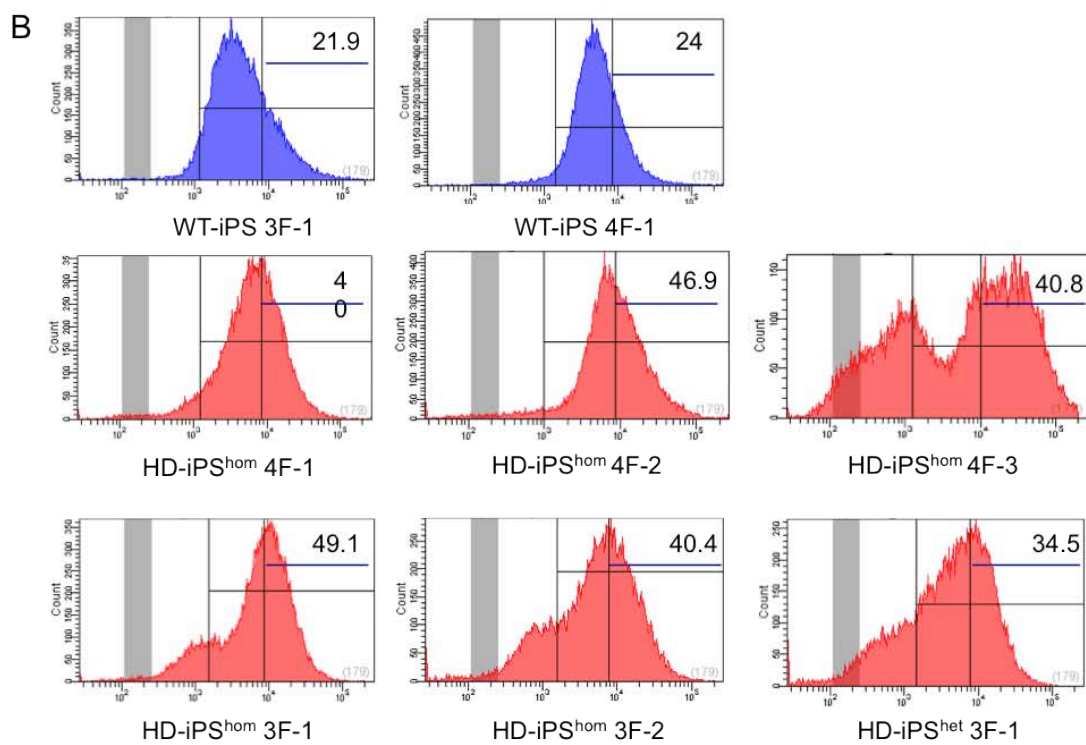
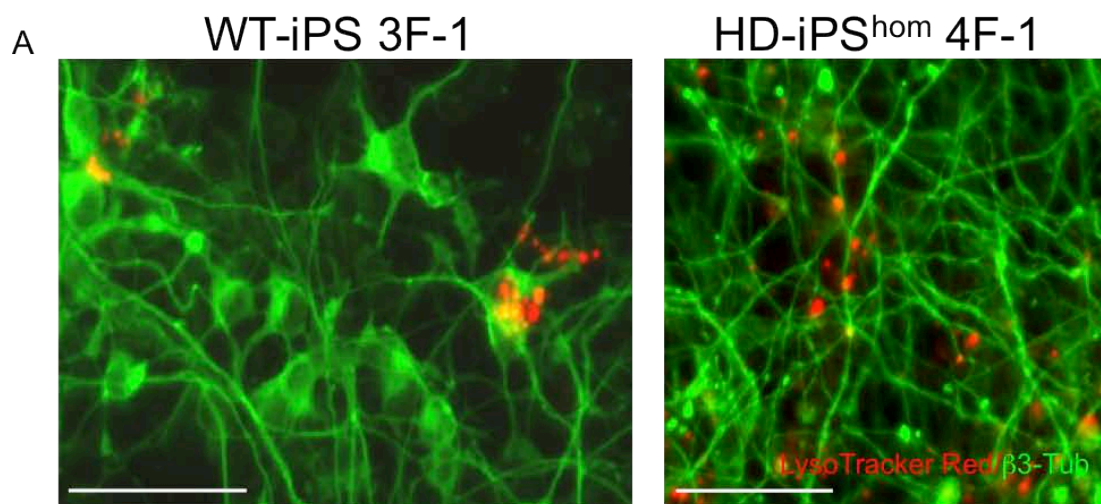




Figura 2.7. Linee di cellule HD-iPS mostrano un aumento del numero di lisosomi durante il differenziamento neurale.

(A) L'analisi del LysoTracker è stata effettuata al giorno 5 del differenziamento neurale sulle linee di cellule WT-iPS 3F-1 e HD-iPS<sup>hom</sup> 4F-1. La linea di cellule HD-iPS mostra un segnale maggiore rispetto alla linea controllo. Barra = 100 micrometri. (B e C) Analisi di citofluorimetria sui cloni di cellule iPS al giorno 25 del differenziamento, dopo esposizione al saccarosio per 48 ore. Le barre blu indicano la proporzione di cellule con valore di intensità del segnale maggiore della soglia posta a  $10^4$ . Sono state analizzate  $2 \times 10^4$  cellule/linea.

Inoltre, i neuroni derivati dalla linea di cellule iPS HD-iPS<sup>het</sup> 3F-1 hanno mostrato risultati simili a quelli esibiti dalle linee cellulari omozigoti (Fig. 4.7C e D). Questi dati suggeriscono che l'attivazione lisosomiale è simile tra i neuroni derivati sia dalle linee di cellule iPS omozigoti che eterozigoti.

Lo stesso fenotipo è stato osservato anche nel modello cellulare di HD-iPS murine (Castiglioni et al., 2012). Per verificare ulteriormente questo dato è stata utilizzata la tecnica del Western Blot per valutare la presenza del marcatore di autofagia LC3 in cellule al giorno 30 del differenziamento. Sono state analizzate le linee di cellule WT-iPS 3F-1, HD-iPS<sup>hom</sup> 4F-1 e HD-iPS<sup>het</sup> 3F-1 (Fig. 4.8A).

La macroautofagia è un processo lisosoma-dipendente che media il *turnover* degli organuli cellulari e delle proteine danneggiate, che non riescono ad essere degradate dal sistema proteasomale, come ad esempio gli aggregati di HTT (Kegel et al., 2000). Dopo la sintesi, LC3 è processato nella proteina citosolica LC3 BI. L'attivazione del processo di macroautofagia porta alla conversione dell'LC3 BI nell' LC3 BII, una forma associata all'autofagosoma. Come conseguenza di questo processo, la quantità di LC3 BII presente è correlata con il numero di autofagosomi. Il rapporto tra LC3 BII/LC3 BI è stato usato come misura della formazione di autofagosomi (Fox et al., 2010; Kabeya et al., 2000) (Fig. 4.8B). In accordo con i dati della marcatura con LysoTracker, la forma LC3 BII è più abbondante nelle linee di cellule HD-iPS rispetto alla linea controllo. Questo dato rinforza l'evidenza di un aumento del numero di lisosomi e specificamente di autofagosomi, nelle linee di cellule HD-iPS. Ciò è in accordo con i dati descritti in un modello di HD di neuroni primari di ratto, trasfettati con HTT mutata (Liang et al., 2011).

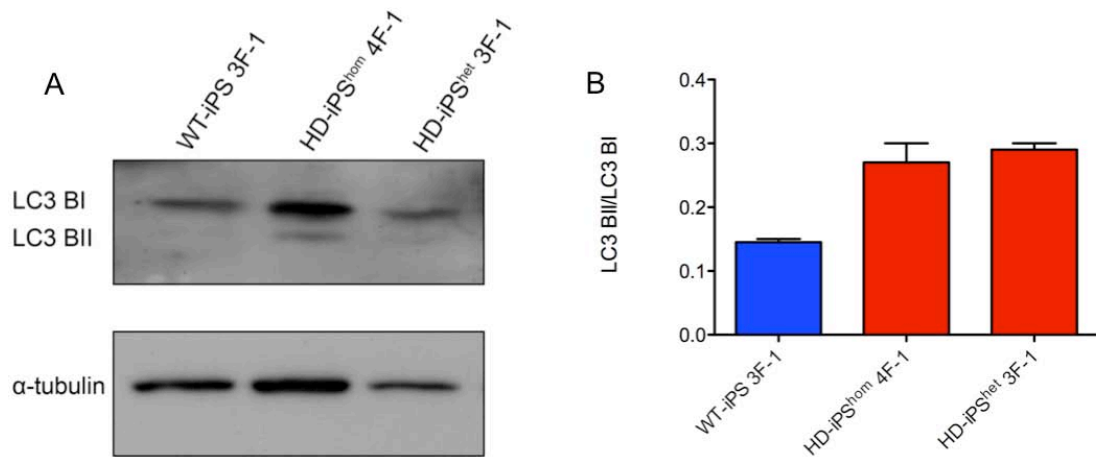


Figura 2.8. L'analisi del marcatore di autofagosoma LC3 conferma una maggiore attivazione del sistema lisosomiale nelle cellule HD-iPS rispetto ai controlli.

(A) Analisi di Western Blot per il marcatore LC3 sulle linee di cellule WT-iPS 3F-1, HD-iPS<sup>hom</sup> 4F-1 and HD-iPS<sup>het</sup> 3F-1, dopo 30 giorni di differenziamento neurale. (B) Analisi densitometrica dell'analisi di Western Blot del marcatore LC3, eseguita sulle cellule WT-iPS 3F-1, HD-iPS<sup>hom</sup> 4F-1 e HD-iPS<sup>het</sup> 3F-1 dopo 30 giorni di differenziamento neurale.

Questi dati ci permettono di concludere che le cellule iPS generate da pazienti HD, mostrano, *in vitro*, caratteristiche simili a quelle delle cellule hES. Inoltre, differenziano verso il fenotipo neurale e sono in grado di ricapitolare alcuni aspetti della patologia. Ciò rende questo tipo cellulare un buon candidato per la generazione di modelli malattia.

## **Discussione**

## **L'interazione tra l'htt e le proteine di polarità cellulare nel controllo del destino cellulare dei progenitori neurali**

I risultati esposti in questa Tesi di dottorato descrivono per la prima volta un collegamento funzionale tra il ruolo dell'htt e quello delle proteine di polarità durante le fasi precoci del processo di neurogenesi, grazie all'utilizzo di diverse linee di cellule embrionali staminali murine. Nel 2012 Lo Sardo e colleghi hanno descritto come l'assenza di htt causi una forte alterazione nel processo di sviluppo neurale e come tale difetto sia stato associato a problemi di adesione cellulare dovuti ad un'iperattività della metallo-proteasi ADAM-10 (Lo Sardo et al., 2012). I progenitori neurali generati da linee cellulari deplete di htt, infatti, non riescono a disporsi in maniera ordinata e le strutture a rosetta mostrano una ridotta capacità a polarizzarsi e ad espandersi correttamente.

In questo lavoro di Tesi abbiamo investigato da un altro punto di vista la natura dell'alterato processo di conversione neurale, considerando una possibile associazione con il meccanismo responsabile della generazione della polarità cellulare.

La polarità è descritta come una condizione di asimmetria di morfologia, di distribuzione di proteine e di funzioni cellulari. Riveste inoltre un ruolo fondamentale per diversi processi che includono la decisione del destino cellulare, il differenziamento e la specializzazione. In particolare durante lo sviluppo del cervello, la polarità apico-basale è in grado di regolare il destino cellulare dei progenitori controllando il bilancio tra divisioni simmetriche proliferative e asimmetriche differenziali (Gotz and Huttner, 2005).

L'idea che i difetti associati all'assenza di htt potessero essere riconducibili a quelli dovuti ad alterazioni dei livelli di proteine di polarità è emersa confrontando diversi lavori in letteratura che riportano una diretta dipendenza tra il destino dei precursori neurali e il livello delle proteine di polarità apicale. Il mantenimento dei corretti livelli di queste proteine, infatti, è indispensabile per il normale processo neurogenico: vi sono numerose evidenze *in vivo* che mostrano come la riduzione dei livelli di CDC42, aPKC, PAR3, PAR6 e PALS1 nelle cellule neuroepiteliali, causi un assottigliamento del numero dei progenitori neurali e una precoce uscita dal ciclo cellulare. Una loro sovra-espressione, invece, stimola la proliferazione, riducendo l'efficienza del differenziamento (Cappello et al., 2006; Lee et al., 2006; Costa et al., 2008; Kim et al., 2010b). Questo comportamento è stato riscontrato in maniera simile anche quando

l'espressione dell'htt viene ridotta nei progenitori corticali, dove provoca un significativo aumento del numero di neuroni generati a scapito dei precursori proliferanti (Godin et al., 2010). Gli autori hanno mostrato come tale difetto sia causato da un alterato orientamento del fuso mitotico. In maniera molto interessante Guilgur e colleghi hanno descritto, lavorando in *Drosophila*, che anche la proteina di polarità aPKC è richiesta per il corretto orientamento del fuso mitotico durante le divisioni simmetriche delle cellule epiteliali (Guilgur et al., 2012).

Oltre a queste prime evidenze in letteratura da lavori effettuati *in vivo*, si aggiunge un altro articolo che ha contribuito notevolmente al concepimento della nostra idea: nel 2011, infatti, Boroviak e Rashbass hanno pubblicato un lavoro che dimostra come l'abbattimento di espressione della proteina di polarità transmembrana CRB2, alteri sostanzialmente il processo di conversione neurale di cellule staminali embrionali murine *in vitro* (Boroviak and Rashbass, 2011), applicando lo stesso protocollo di differenziamento utilizzato da Lo Sardo e colleghi. Possiamo considerare anche questo, dunque, un altro indizio di similarità di azioni tra l'htt e le proteine di polarità apicale durante il processo neurogenico.

Sulla base di queste premesse, abbiamo rianalizzato i differenziamenti di cellule staminali embrionali deplete di htt, soffermandoci su parametri che solitamente vengono collegati alla perturbazione dei processi di polarizzazione cellulare nel neurosviluppo: l'efficienza di conversione neurale e la proliferazione dei progenitori neuroepiteliali.

Per prima cosa è stato confermato il fenotipo *rosetteless*: le rosette neurali generate mostrano una forte disorganizzazione nell'assumere la tipica struttura polarizzata attorno ad un lume centrale. È stato inoltre molto interessante osservare una generale riduzione della proliferazione delle cellule neuroepiteliali grazie a diversi esperimenti che hanno valutato: (i) l'abbondanza e la localizzazione di cellule mitoticamente attive pPH3 positive, (ii) l'analisi delle diverse fasi del ciclo cellulare (G0/G1, S e G2/M), (iii) l'abbondanza di progenitori PAX6 positivi, (iv) l'accensione durante i giorni precoci del differenziamento *in vitro* dei marcatori tipici di neuroepitelio PAX6 e Nestin. L'insieme di questi risultati porta univocamente ad una convergenza di evidenze volte a dimostrare una sostanziale diminuzione della capacità proliferativa dei progenitori neurali generati. Questi dati sono corroborati poi dall'analisi a giorni più tardivi del processo di gliogenesi (v) che, durante il normale sviluppo embrionale, è un evento che segue la neurogenesi (Guillemot, 2007). E' stato osservato che la deplezione di htt favorisce una

precoce accensione del tipico marcatore di astrociti GFAP. Ciò potrebbe indicare effettivamente un più rapido differenziamento cellulare che porta i progenitori ad entrare precocemente del *lineage* astrocitario. Tale risultato è stato inoltre riportato anche in un altro lavoro *in vitro* volto alla comparazione fenotipica di linee di cellule neurali staminali deplete di htt (Conforti et al., 2013).

Inoltre, è sicuramente peculiare il lavoro di Lorincz e Zawitowski del 2009, in cui è mostrato che mES esprimenti un tratto CAG poli-espanso differenziano più velocemente verso il *lineage* neuronale, uscendo prima dal ciclo cellulare (Lorincz and Zawitowski, 2009). Questo comportamento potrebbe essere in accordo con la teoria del *loss of function* dell'htt normale. Secondo il ragionamento sopra riportato questa condizione porterebbe le cellule a proliferare meno e differenziare prima.

Sulla base della similarità di comportamento tra determinanti di polarità e htt, è stato inoltre interessante valutare la localizzazione di quest'ultima durante le fasi precoci di sviluppo neurale, per poter studiare se anche il segnale ad essa associato risulti più intenso nella regione neurogenica apicale. Sia i dati ricavati dalle analisi su rosette neurali, sia quelli ottenuti dallo studio di sezioni di embrioni murini di età gestazionale E12.5, hanno rivelato un arricchimento del segnale nella regione luminale delle rosette neurali *in vitro* e nella zona ventricolare nelle sezioni *in vivo*. Il segnale localizzato in prossimità dei determinanti apicali di polarità potrebbe essere una importante conferma del suo coinvolgimento nella definizione della polarità apico-basale della cellula neuroepiteliale e, conseguentemente, nella regolazione degli eventi che controllano l'equilibrio tra proliferazione e differenziamento dei progenitori neurali durante lo sviluppo neurale.

Se consideriamo il collegamento tra l'arricchimento nella localizzazione di proteine a livello della membrana apicale di progenitori neurali con il loro ruolo nella regolazione e mantenimento della proliferazione cellulare, dobbiamo sicuramente considerare i lavori sulle proteine Staufen e USP9X. Staufen è stata una proteina nota per la sua azione nel legare specifici RNA messaggeri e regolarne la corretta localizzazione (Goetze et al., 2006; Kiebler et al., 1999), fino a quando nel 2012 due lavori hanno associato la localizzazione di Staufen nella zona ventricolare del cervello embrionale con il suo coinvolgimento nella regolazione del destino dei precursori neurali (Vessey et al., 2012; Kusek et al., 2012). In accordo con quanto osservato con altri marcatori di

polarità, una sovra-espressione della proteina Staufén ha effetto sul destino dei progenitori neurali, stimolando divisioni simmetriche proliferative.

USP9X invece, è un enzima deubiquitinilante che controlla il *turnover* delle proteine cellulari ed è riconosciuto come un tipico marcatore di “staminalità” (Ivanova et al., 2002; Ramalho-Santos et al., 2002). Nel 2009 Jolly e colleghi hanno dimostrato per la prima volta il ruolo di questa proteina nella regolazione della polarità apico-basale e nel differenziamento neurale di cellule staminali embrionali murine, applicando di nuovo il protocollo di Ying (Jolly et al., 2009). Cellule overesprimenti USP9X presentavano un altissimo numero di progenitori organizzati in rosette neurali e un rapporto progenitori:neuroni tre volte maggiore rispetto al controllo.

Inoltre, anche in questo caso è stata associata una marcata localizzazione a livello ventricolare e luminale.

Sulla base di queste evidenze è inoltre estremamente interessante osservare che l'htt è in grado di interagire sia con Staufén che USP9X. Savas e colleghi hanno effettuato analisi di dendriti di neuroni adulti murini per studiare la co-localizzazione dell'htt con la proteina Staufén. Queste analisi hanno dimostrato che l'htt è associata a componenti dei granuli neurali e partecipa nel trasporto di mRNA nei dendriti (Savas et al., 2010).

Kaltenbach ha condotto invece studi di co-immunoprecipitazione dell'htt con USP9X lavorando su cervelli adulti di topo (Kaltenbach et al., 2007).

Potrebbe essere possibile che queste interazioni, attestate negli stadi adulti, si stabilizzino già nelle fasi precoci dello sviluppo e siano un indice che l'htt effettivamente si localizzi e collabori con le proteine apicali coinvolte nella definizione della polarità apico-basale dei progenitori neurali.

Sulla base di queste osservazioni è ancora più interessante il nostro risultato che collega direttamente l'htt alla proteina aPKC.

Dopo aver validato infatti, da un punto di vista fenotipico la similarità d'azione tra htt e proteine espresse a livello della membrana apicale, in questo lavoro di Tesi abbiamo cercato di identificare il meccanismo molecolare alla base di questo processo. Abbiamo identificato una nuova interazione funzionale con la proteina del complesso di PAR, aPKC. La protein chinasi aPKC, la cui attività è stimolata da CDC42, svolge un ruolo primario nei meccanismi che portano alla polarizzazione epiteliale grazie al legame che instaura con PAR6 (Garrard et al., 2003; Macara, 2004; Goldstein and Macara, 2007; Iden and Collard, 2008). Nel normale processo di polarizzazione epiteliale, infatti,

CDC42 nella sua forma attivata è in grado di legare la proteina PAR6. PAR6 interagisce costitutivamente con la chinasi aPKC tramite la sua porzione N terminale. In seguito al legame che si crea tra CDC42 e PAR6, il dimero PAR6-aPKC esiste ora nella propria forma attivata e può traslocare nella porzione più apicale, dove aPKC esercita la propria azione chinastica a livello di PAR3, LGL e CRB2 (Yamanaka et al., 2001; Sotillos et al., 2004). La fosforilazione di queste proteine permette la loro precisa localizzazione nel corretto compartimento cellulare per contribuire alla generazione e al mantenimento della polarità apico-basale. I meccanismi precisi che permettono l'attivazione di aPKC sono ancora sotto indagine. Alcune teorie sostengono l'esistenza di una modifica conformazionale di PAR6 indotta da CDC42 (Macara, 2004). Un'altra possibilità potrebbe essere la capacità di PAR6 di reclutare specifici substrati per la chinasi aPKC, come per esempio PAR3 (Lin et al., 2000; Hirose et al., 2002). Studi più recenti riportano che PAR6 può attivare aPKC allostericamente per permettere la sua corretta localizzazione spazio temporale (Graybill et al., 2012). Sebbene dunque il meccanismo di regolazione di aPKC debba ancora essere completamente elucidato, rimane invece evidente la propria funzione cruciale nel localizzare nella corretta posizione cellulare le proteine LGL, PAR3 e CRB. In particolare studi in *Drosophila* hanno evidenziato come aPKC sia inizialmente mantenuto in uno stato inattivato grazie al contemporaneo legame con PAR6 e LGL. In seguito all'attivazione esercitata da CDC42, LGL può essere fosforilato e si sgancia dal complesso (Lin et al., 2000; Moscat et al., 2006). In seguito il complesso binario PAR6-aPKC trasloca nella porzione apicale e LGL in quella baso-laterale.

Sulla base di queste informazioni possiamo ipotizzare una teoria sul meccanismo di interazione dell'htt con aPKC. Come mostrato nei risultati, infatti, risulta evidente che nelle cellule WT i livelli di aPKC si mantengono a livelli elevati durante i giorni del differenziamento neurale. Nelle cellule KO invece, i livelli di aPKC decrescono significativamente. Inoltre i livelli di proteina fosforilata e attiva sono ulteriormente ridotti. Tramite saggio di immunoprecipitazione è stato confermata l'interazione fisica tra htt e aPKC in condizioni fisiologiche.

L'ipotesi è, dunque, che in condizioni normali l'htt si lega al complesso binario aPKC-PAR6, stabilizzando in qualche modo il dimero stesso e permettendo la normale attività di fosforilazione di aPKC sui propri bersagli. In questo modo la polarizzazione cellulare avviene in modo corretto e i progenitori proliferano in modo organizzato (Fig. 5.1A).



In assenza di htt il complesso PAR6-aPKC viene comunque attivato da CDC42 (i cui valori sono inalterati in presenza o assenza di htt normale) come nella situazione normale, ma in seguito ci potrebbe essere una mancata stabilizzazione, o corretta di attivazione di aPKC, che in questo modo non può fosforilare in maniera sufficiente i propri target, che a loro volta non si dispongono nel corretto compartimento cellulare (Fig. 5.1B). In questo modo il processo di polarizzazione è alterato e ciò si riflette su una non omogenea proliferazione a livello dei progenitori neurali.

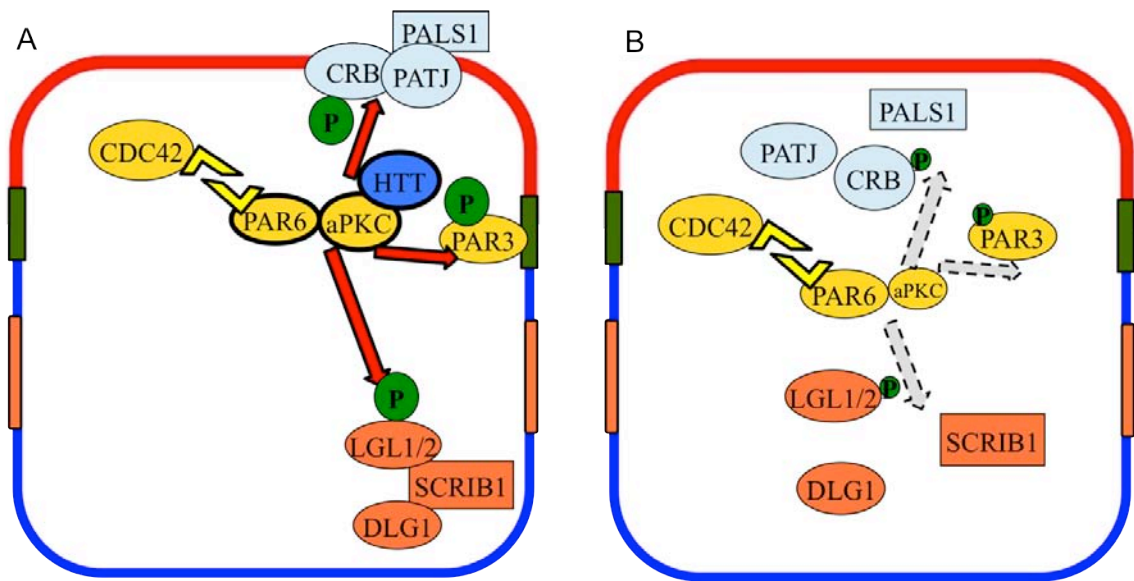


Figura 5.1 Rappresentazione schematica dell'ipotetico meccanismo di interazione tra l'htt e il complesso binario aPKC-PAR6. (A) Situazione in presenza di htt. (B) Situazione in assenza di htt.

Per verificare la veridicità della nostra ipotesi sono già stati identificati i seguenti esperimenti chiave: (i) tramite saggio di CO-IP, misurare il *binding* tra PAR6 e aPKC in presenza ed assenza di htt per capire se il legame tra le 2 proteine possa essere alterato; (ii) analizzare la localizzazione di PAR6 e aPKC: potrebbe infatti accadere che l'assenza di htt possa inficiare la corretta traslocazione in membrana apicale del dimero, che in questo modo non può esercitare correttamente la propria funzione regolatoria; (iii) analisi di fosforilazione delle proteine bersaglio di aPKC: se effettivamente aPKC dovesse avere livelli di attivazioni minori, ci si aspetterebbe una ridotta attività chinastica; (iv) saggio di CO-IP tra PAR6 e LGL: potrebbe infatti succedere che in assenza di htt, aPKC non riesca a fosforilare correttamente LGL, che quindi rimarrebbe

in questo modo legato a PAR6 in una porzione cellulare ectopica e diversa da quella baso-laterale.

I risultati di questi esperimenti saranno cruciali per la conferma del meccanismo proposto. Intanto, l'analisi dei dati già ottenuti tramite saggio di complementazione con CDC42 sono pienamente in accordo con questa ipotesi.

E' utile ricordare che CDC42 è stato identificato come iniziatore del processo di polarizzazione (Yamanaka et al., 2001; Hutterer et al., 2004; Melendez et al., 2011), mentre per l'htt è stato da noi ipotizzato un ruolo stabilizzatore sul dimero attivato aPKC-PAR6. In accordo con questa affermazione, l'assenza di CDC42 crea difetti di polarizzazione nei differenziamenti *in vitro* ancora più marcati rispetto a quelli osservati in assenza di htt. La complementazione di CDC42 nelle cellule deplete di htt riesce a ripristinare un corretto fenotipo, mentre l'overespressione di htt in cellule KO per CDC42 reverte solo parzialmente il difetto.

Sembra per cui che aumentando i livelli di CDC42, si possa sostituire il ruolo stabilizzatore dell'htt, grazie ad un'azione a monte che permette un incremento dell'attivazione di aPKC. Ciò non è possibile nella condizione di assenza di CDC42, dove anche livelli overespressi di htt non possono comunque attivare maggiormente il *pathway* di polarità.

E' stato quindi approfondito lo studio sulle alterazioni biochimiche che l'alterata attivazione di aPKC può comportare. In particolare il segnale di WNT è estremamente interessante perché lungo questo *pathway* convergono sia (i) i segnali che controllano il destino cellulare durante lo sviluppo neurale, che (ii) alcune vie di trasduzione mediate da aPKC.

Il segnale di WNT/ $\beta$ -catenina, infatti, svolge un ruolo fondamentale nei processi che regolano il destino dei progenitori neuroepiteliali (Chenn and Walsh, 2002; Zechner et al., 2003).

In seguito all'attivazione del segnale di WNT, GSK3 viene fosforilato e ciò comporta la sua inattivazione (e conseguente stabilizzazione di  $\beta$ -catenina). Alterazioni nella fine regolazione di GSK3 causano una mancata coordinazione tra proliferazione e differenziamento dei progenitori neurali durante le fasi precoci di sviluppo del cervello (Kim et al., 2009b).

Inoltre GSK3 è direttamente collegato ai processi che regolano la polarizzazione neuroepiteliale (Hur and Zhou, 2010; Kim and Snider, 2011; Freese et al., 2010). Nello specifico, il lavoro di Etienne-Manneville ha dimostrato come GSK3 sia anche un importante *target* a valle del segnale di CDC42, mediato proprio dall'attivazione di aPKC (Etienne-Manneville and Hall, 2003). Inoltre è stato descritto il ruolo convergente di CDC42 e GSK3 nella modulazione e nel mantenimento della corretta polarizzazione di cellule della glia radiale (Yokota et al., 2010).

I risultati che abbiamo ottenuto mostrano che effettivamente il *pathway* di aPKC influenza direttamente la via di segnalazione di WNT. Infatti, considerando che in assenza di htt i livelli di aPKC sono fortemente ridotti, la fosforilazione di GSK3 risulta essere diminuita: ciò comporta la fosforilazione di  $\beta$ -catenina con successiva degradazione al proteasoma e una mancata azione nucleare.

Sulla base di questa evidenza, abbiamo ipotizzato che l'htt sana stabilizzando i livelli di aPKC, permette anche l'azione della normale via del segnale di WNT.

A supporto del collegamento tra il complesso attivato PAR6-aPKC e l'inattivazione di GSK3, il lavoro di Wu e collaboratori mostra effettivamente che in cellule deplete di CDC42 (attivatore dell'azione di aPKC) la fosforilazione di GSK3 non può avvenire (Wu et al., 2007).

Sulla base di queste osservazioni abbiamo pensato di utilizzare uno specifico inibitore di GSK3 per cercare di revertire farmacologicamente (oltre che tramite stimolazione genetica del *pathway* di polarità) il fenotipo *rosetteless* in cellule deplete di htt.

Per questa tipologia di esperimenti è stata scelta la molecola CHIR99021.

Seguendo il ragionamento sopra riportato, l'attivazione del segnale di WNT potrebbe stimolare sia la proliferazione, che la polarizzazione dei progenitori neuroepiteliali. In accordo con questa ipotesi è stato recentemente mostrato che proprio il trattamento con CHIR99021 promuove il *self-renewal* di progenitori neurali derivati da cellule iPS umane (Esfandiari et al., 2012). Inoltre il gruppo di Rashbass, usando il CHIR99021 ha mostrato che è possibile ristabilire la corretta sopravvivenza cellulare di progenitori KO per CRB2, che quando vengono sottoposte al protocollo di conversione neurale usato in questo progetto (Ying et al., 2003) presentano difetti di differenziamento e ridotta vitalità cellulare (Boroviak and Rashbass, 2011).

Sono state testate diverse condizioni di utilizzo del CHIR99021 durante i giorni del differenziamento neurale di cellule deplete di htt, ma nelle nostre mani non siamo riusciti mai ad avere risultati apprezzabili (dati non mostrati). Abbiamo invece osservato

una massiccia iperproliferazione cellulare, senza distinguere però proprietà morfologiche e antigeniche tipiche di progenitori neurali. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che il CHIR99021 viene utilizzato anche come molecola chiave per il mantenimento dello stato pluripotente e indifferenziato di cellule mES (Ying et al., 2008).

Probabilmente la mirata e specifica inattivazione di GSK3 non è sufficiente ad indurre le attivazioni di diversi segnali che, nelle linee WT, permettono il normale processo di conversione neurale, anche se studi successivi potranno chiarire ulteriormente la possibilità dell'utilizzo del CHIR99021, magari in combinazione con altre molecole dotate di azione specifica su alcune proteine di polarità.

Per concludere, i risultati descritti in questa prima parte di Tesi di dottorato mostrano come effettivamente un collegamento funzionale tra htt e proteine di polarità esista e si manifesti durante la conversione neurale di cellule staminali embrionali.

Sarà interessante in futuro verificare se anche nell'HD, una parte delle alterazioni dovute all'assenza di htt sana (teoria del *loss of function*), possono instaurarsi già nella fase gestazionale e influenzare il normale sviluppo cerebrale. Fino ad oggi non sono ancora stati riportati studi su pazienti, anche se un lavoro molto intrigante ha mostrato che individui sani con un numero crescente di CAG nel *range* normale, posseggono un aumento di sostanza grigia (Muhlau et al., 2012). Questo potrebbe sostenere un nuovo ruolo dell'htt (e specialmente la propria regione N terminale dove è identificato il tratto CAG) come regolatore del destino cellulare di progenitori neurali. Questo meccanismo potrebbe di conseguenza influenzare il numero finale di neuroni generati.

Infine, come ultimo spunto di discussione è particolare osservare che sia l'htt che i membri dei complessi di polarità hanno un'origine evolutivamente ancestrale. CDC42 compare nel lievito per regolarne la polarità e le divisioni simmetriche o asimmetriche (Johnson, 1999). Analogamente la proteina aPKC in *Drosophila* è richiesta per il corretto orientamento del fuso mitotico durante divisioni di cellule epiteliali (Guilgur et al., 2012). Essendo anche l'htt una proteina dalle origini molto antiche è affascinante considerare che il suo ruolo possa contribuire alla regolazione del differenziamento, intervenendo sui processi che regolano la definizione della polarità apico-basale e, di conseguenza, le divisioni e il destino cellulare.

## **Lo studio di un modello malattia, attraverso la generazione di cellule iPS da pazienti affetti da HD**

Nella seconda parte di questo lavoro di Tesi sono state generate diverse linee di cellule iPS a partire dai fibroblasti di tre pazienti affetti da HD, di cui due con un raro aplotipo omozigote per la mutazione. E' stato dimostrato come sia possibile derivare, sia da pazienti eterozigoti che omozigoti, linee di cellule iPS dotate delle tipiche caratteristiche di cellule pluripotenti: in grado cioè di essere espanse all'infinito e di differenziare verso i tipi cellulari appartenenti ai tre foglietti germinativi (tra cui i neuroni, la tipologia cellulare colpita dall'HD).

La tecnologia della riprogrammazione somatica ha permesso di verificare come la mutazione, e anche la presenza di due alleli mutati, non infici il processo di riprogrammazione e il differenziamento neurale. Le linee di HD-iPS sono state generate tramite l'uso di 4 o 3 fattori di riprogrammazione (OCT4, SOX2, KLF4 con o senza C-MYC), e in entrambi i casi il processo è stato efficiente. Inoltre non sono state identificate differenze nell'espressione di marcatori di pluripotenza, nella morfologia delle colonie e nel *rate* di crescita. Anche in seguito a differenziamento neurale il comportamento tra le linee generate con 3 o 4 fattori è stato paragonabile.

Considerando ulteriori criteri necessari per definire la pluripotenza, come il saggio di formazione di teratoma *in vivo*, questi sono stati ampiamente soddisfatti. I teratomi, i teratocarcinomi e i tumori del sacco vitellino sono abbastanza comuni nell'uomo; spesso si presentano in individui giovani e in bambini. E' frequente che questi tipi di formazioni contengano strutture simili a quelle del sacco vitellino (Almstrup et al., 2007; Pierce et al., 1970; Prevedello et al., 2007). In questo lavoro è stata osservata per la prima volta la formazione di teratomi contenenti tessuto di sacco vitellino a partire da cellule iPS, in seguito a trapianto di cellule hiPS in topi immuno-compromessi.

L'instabilità del tratto CAG è un fenomeno ben documentato nei gameti affetti da HD. Questo evento può causare l'anticipazione della malattia nella generazione successiva (Pearson et al., 2005; Yoon et al., 2003). L'instabilità del tratto CAG è stata anche osservata nei linfoblasti, quando l'espansione del tratto CAG supera le 60 ripetizioni (Cannella et al., 2009), ma anche in cellule somatiche ed in particolare in neuroni post-mitotici murini (Dragileva et al., 2009; Gonitell et al., 2008), ed in neuroni cerebrali umani (Kennedy et al., 2003). Sebbene non sia stata osservata nessuna instabilità del

tratto CAG in tessuto fetale HD (Benitez et al., 1995), è stato comunque dapprima verificato che il processo di riprogrammazione non inficiasse la lunghezza del tratto ripetuto (Park et al., 2008; Zhang et al., 2010). Inoltre, non è stato osservato nessun cambiamento anche dopo diversi passaggi in coltura, fino a 40. Questi risultati sono in accordo con i dati osservati in modelli cellulari di HD basati su hES (Niclis et al., 2009; Seriola et al., 2011). Successivamente, abbiamo verificato la stabilità dell'espansione del tratto CAG anche in seguito a differenziamento neurale. Al giorno 30 del differenziamento, quando approssimativamente il 15-30% delle cellule ha assunto un fenotipo neurale, in tutte le quattro linee di HD-iPS omozigoti analizzate è stata identificata una delezione di due triplette su un allele. Seriola e collaboratori non hanno osservato differenze nell'espansione del tratto CAG nelle linee di HD-hES eterozigoti (Seriola et al., 2011); tuttavia, un altro studio ha riportato un basso livello di instabilità in neurosfere derivate da due linee di HD-hES, con un'espansione di 5 ripetizioni del CAG (Niclis et al., 2009). In uno studio recente (Consortium, 2012) è stata però riportata un'espansione del tratto CAG in condizione di proliferazione di cellule staminali neurali derivate da una linea di HD-iPS. L'espansione sembra associata ad una maggiore lunghezza del tratto CAG, in quanto linee cellulari derivate in modo analogo, ma con un tratto CAG più corto non hanno mostrato instabilità (Consortium, 2012).

Successivamente, analizzando la propensione al differenziamento neurale, è stata osservata variabilità nell'efficienza di differenziamento tra le diverse linee. Un'analisi del comportamento di tutte le linee di HD-iPS, incluse le quattro derivate dalla stessa linea di fibroblasti, ha evidenziato come la variabilità sia intrinseca delle linee di cellule iPS (derivate da diverse linee di fibroblasti), o addirittura dei singoli cloni di cellule iPS (derivati dalla stessa linea di fibroblasti), non riflettendo nessun ruolo della mutazione del tratto CAG. La variabilità osservata tra le linee è compatibile con le recenti osservazioni sulla propensione innata al differenziamento delle diverse linee di cellule pluripotenti umane, sia hES che hiPS (Hu et al., 2010; Kim et al., 2010a; Osafune et al., 2008). In uno studio recente è stato identificato il miR-371-3 come un marcatore predittivo della propensione al differenziamento neurale (Kim et al., 2011), il cui livello di espressione è inversamente correlato alla capacità di differenziare verso il *lineage* neuronale. Ciò potrebbe essere utilizzato per selezionare linee altamente differenziabili *in vitro*.

Nonostante l'intrinseca variabilità fra i cloni di cellule iPS, sia le linee WT-iPS che HD-iPS hanno mostrato capacità di differenziare verso un destino telencefalico (cellule *SIX3* e *FOXG1* positive), e ulteriormente verso il *lineage* striatale (cellule *GAD65/67*, *ARPP-21* e *DARPP-32* positive), quello selettivamente colpito dalla presenza della mutazione. Queste analisi non hanno rivelato differenze di comportamento tra le linee di cellule WT o HD, dimostrando come la mutazione non altera la maturazione neurale, in accordo con il fatto che individui omozigoti per la mutazione nascono asintomatici (Squitieri et al., 2003). Questa evidenza è però in contrasto con quanto descritto in un altro lavoro (Molero et al., 2009) in cui sono invece presentate alterazioni nella specificazione neurale. Attualmente questo aspetto è particolarmente dibattuto e i dati a disposizione sono ancora contrastanti.

Tra i diversi fenotipi molecolari legati all'HD, è stato descritto un incremento del processo di autofagia nei cervelli murini di modelli HD. Ciò causa una compromissione, nel lungo tempo, del sistema di *clearance* di proteine tossiche (Martinez-Vicente et al., 2010). Nel modello descritto in questo lavoro di Tesi, è stata osservata una maggiore attivazione lisosomiale nelle linee di HD-iPS rispetto ai controlli, sia in condizione di *self-renewal* che in differenziamento. Ciò è stato accompagnato da un aumento del numero rilevato sperimentalmente di compartimenti acidi subcellulari, suggerendo un attivo processo di degradazione proteica. Questo processo potrebbe essere un iniziale tentativo di difesa della cellula verso la tossicità causata dagli aggregati di HTT mutata. A lungo termine però si pensa che l'*over*-attivazione lisosomiale possa contribuire ulteriormente alla tossicità cellulare, dovuta all'ingolfamento del sistema lisosomiale-autofagico, che in questo modo non è in grado di smaltire proteine tossiche o alterate, derivate da altri processi catabolici.

Nel complesso, queste osservazioni suggeriscono che le linee cellulari di HD-iPS generate sono in grado di replicare, *in vitro*, alcuni fenotipi molecolari e biologici tipicamente osservati nella patologia, mantenendo la loro capacità di generare neuroni. Soprattutto, è emerso dall'intero lavoro come sia fondamentale, in studi *in vitro* di generazione di modelli malattia, analizzare e considerare molteplici cloni di una stessa linea di cellule iPS, in quanto è presente una forte componente di variabilità intrinseca *inter-clone*. Ciò potrebbe mascherare o esasperare fenotipi legati alla malattia. A questo scopo è necessario validare ulteriori fenotipi su diversi cloni e su diverse linee.

Inoltre dai risultati mostrati nel nostro lavoro emerge anche un altro importante concetto: quello dell'importanza di sottoporre il modello- malattia *in vitro* a debiti stress cellulari, col fine di cercare in questo modo di simulare il più fedelmente possibile la situazione compromessa delle cellule colpite dalla mutazione. Questa strategia, nel nostro caso rappresentata dall'ingolfamento lisosomiale tramite stress da accumulo di saccarosio, potrebbe essere decisiva per tutti gli studi *in vitro* che riguardano malattie con insorgenza nell'età adulta.

Tramite il trattamento con diverse tipologie di agenti stressanti, si vuole cercare di replicare velocemente *in vitro* la somma di alterazioni dovute al normale processo di invecchiamento cellulare. Probabilmente solo in questo caso, infatti, i difetti fenotipici collegati alla mutazione, possono essere più facilmente rilevabili.

In linea con questa teoria il Prof. Lorenz Studer sta proprio ottimizzando un semplice sistema *in vitro* per simulare/accelerare il processo di invecchiamento per studiare più fedelmente l'effetto di mutazioni di diverse malattie neurodegenerative ad insorgenza adulta. Tale metodo si basa sull'espressione forzata della proteina progerina, responsabile di una rara malattia genetica chiamata Progeria o sindrome di Hutchinson-Gliford, che colpisce un bambino su 8 milioni e ne provoca l'invecchiamento precoce e la morte nei primi anni. La progerina è il risultato dalla mutazione genetica di un gene, *lamin A*, che si trova nei cromosomi paterni e provoca una serie di sintomi come la perdita di capelli, aterosclerosi precoce e anomalie muscoloscheletriche. Risultati preliminari mostrati in un recente workshop, sembrano confermare come tale metodologia possa evidenziare specifici fenotipi-malattia, non rilevabili in condizioni di assenza di agenti stressanti.

Nell'insieme le evidenze riportate in questa Tesi confermano che in futuro la rivoluzionaria tecnologia della riprogrammazione somatica potrebbe rappresentare un valido sistema per la generazione di modelli malattia, fornendo una piattaforma da utilizzare per studi di *drug-screening* e per l'identificazione di potenziali target farmacologici associati all'HD. Inoltre, per studi successivi è necessario sottolineare l'importanza di esporre le diverse linee di cellule iPS ad un e robusto protocollo per il differenziamento diretto di cellule pluripotenti verso neuroni striatali, recentemente descritto in questo laboratorio (Carri et al., 2013). In questo modo sarà possibile affinare le nostre indagini su una popolazione arricchita nella componente neuronale



selettivamente colpita dalla malattia in modo da poter confermare/validare i fenotipi associati già evidenziati.

Infine sarà molto stimolante verificare se le alterazioni identificate lungo il *pathway* di polarità apico-basale, dovute al *loss of function* dell'htt sana, potranno essere replicate anche sulle cellule pluripotenti derivate da pazienti.

Questo sarà particolarmente interessante da osservare specialmente nel raro caso di omozigosi per la mutazione (attualmente siamo l'unico laboratorio al mondo a possedere tali linee di cellule iPS-HD umane), dove l'effetto della proteina sana è assolutamente assente.

## **Bibliografia**

1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72, 971-983.

Abranches, E., Silva, M., Pradier, L., Schulz, H., Hummel, O., Henrique, D., Bekman, E., 2009. Neural differentiation of embryonic stem cells in vitro: a road map to neurogenesis in the embryo. *PloS one* 4, e6286.

Almstrup, K., Leffers, H., Lothe, R.A., Skakkebaek, N.E., Sonne, S.B., Nielsen, J.E., Rajpert-De Meyts, E., Skotheim, R.I., 2007. Improved gene expression signature of testicular carcinoma in situ. *International journal of andrology* 30, 292-302; discussion 303.

Altar, C.A., Cai, N., Bliven, T., Juhasz, M., Conner, J.M., Acheson, A.L., Lindsay, R.M., Wiegand, S.J., 1997. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 389, 856-860.

An, M.C., Zhang, N., Scott, G., Montoro, D., Wittkop, T., Mooney, S., Melov, S., Ellerby, L.M., 2012. Genetic correction of Huntington's disease phenotypes in induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 11, 253-263.

Assemat, E., Bazellieres, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A., Massey-Harroche, D., 2008. Polarity complex proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1778, 614-630.

Attardo, A., Calegari, F., Haubensak, W., Wilsch-Brauninger, M., Huttner, W.B., 2008. Live imaging at the onset of cortical neurogenesis reveals differential appearance of the neuronal phenotype in apical versus basal progenitor progeny. *PloS one* 3, e2388.

Auerbach, W., Hurlbert, M.S., Hilditch-Maguire, P., Wadghiri, Y.Z., Wheeler, V.C., Cohen, S.I., Joyner, A.L., MacDonald, M.E., Turnbull, D.H., 2001. The HD mutation causes progressive lethal neurological disease in mice expressing reduced levels of huntingtin. *Human molecular genetics* 10, 2515-2523.

Baquet, Z.C., Gorski, J.A., Jones, K.R., 2004. Early striatal dendrite deficits followed by neuron loss with advanced age in the absence of anterograde cortical brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 4250-4258.

Bellin, M., Marchetto, M.C., Gage, F.H., Mummery, C.L., 2012. Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nature reviews. Molecular cell biology* 13, 713-726.

Benitez, J., Robledo, M., Ramos, C., Ayuso, C., Astarloa, R., Garcia Yebeles, J., Brambati, B., 1995. Somatic stability in chorionic villi samples and other Huntington fetal tissues. *Human genetics* 96, 229-232.

Bennett, E.J., Shaler, T.A., Woodman, B., Ryu, K.Y., Zaitseva, T.S., Becker, C.H., Bates, G.P., Schulman, H., Kopito, R.R., 2007. Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature* 448, 704-708.

Bhat, M.A., Izaddoost, S., Lu, Y., Cho, K.O., Choi, K.W., Bellen, H.J., 1999. Discs Lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity. *Cell*. Mar 19;96(6):833-45. Erratum in: *Cell*. 2003 Dec 12;115(6):765-6.

Bilder, D., Perrimon, N., 2000. Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* 403, 676-680.

Bohl, J., Brimer, N., Lyons, C., Vande Pol, S.B., 2007. The stardust family protein MPP7 forms a tripartite complex with LIN7 and DLG1 that regulates the stability and localization of DLG1 to cell junctions. *The Journal of biological chemistry* 282, 9392-9400.

Boroviak, T., Rashbass, P., 2011. The apical polarity determinant Crumbs 2 is a novel regulator of ESC-derived neural progenitors. *Stem cells* 29, 193-205.

Bradley, C.K., Scott, H.A., Chami, O., Peura, T.T., Dumevska, B., Schmidt, U., Stojanov, T., 2011. Derivation of Huntington's disease-affected human embryonic stem cell lines. *Stem cells and development* 20, 495-502.

Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G.G., Lengner, C.J., Wernig, M., Suh, H., Jaenisch, R., 2008. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell stem cell* 2, 151-159.

Cadigan, K.M., Liu, Y.I., 2006. Wnt signaling: complexity at the surface. *Journal of cell science* 119, 395-402.

Camnasio, S., Delli Carri, A., Lombardo, A., Grad, I., Mariotti, C., Castucci, A., Rozell, B., Lo Riso, P., Castiglioni, V., Zuccato, C., Rochon, C., Takashima, Y., Diaferia, G., Biunno, I., Gellera, C., Jaconi, M., Smith, A., Hovatta, O., Naldini, L., Di Donato, S., Feki, A., Cattaneo, E., 2012. The first reported generation of several induced pluripotent stem cell lines from homozygous and heterozygous Huntington's disease patients demonstrates mutation related enhanced lysosomal activity. *Neurobiology of disease* 46, 41-51.

Cannella, M., Maglione, V., Martino, T., Ragona, G., Frati, L., Li, G.M., Squitieri, F., 2009. DNA instability in replicating Huntington's disease lymphoblasts. *BMC medical genetics* 10, 11.

Cappello, S., Attardo, A., Wu, X., Iwasato, T., Itohara, S., Wilsch-Brauninger, M., Eilken, H.M., Rieger, M.A., Schroeder, T.T., Huttner, W.B., Brakebusch, C., Gotz, M., 2006. The Rho-GTPase cdc42 regulates neural progenitor fate at the apical surface. *Nature neuroscience* 9, 1099-1107.

Carey, B.W., Markoulaki, S., Hanna, J., Saha, K., Gao, Q., Mitalipova, M., Jaenisch, R., 2009. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 157-162.

Carri, A.D., Onorati, M., Lelos, M.J., Castiglioni, V., Faedo, A., Menon, R., Camnasio, S., Vuono, R., Spaiardi, P., Talpo, F., Toselli, M., Martino, G., Barker, R.A., Dunnett,

S.B., Biella, G., Cattaneo, E., 2013. Developmentally coordinated extrinsic signals drive human pluripotent stem cell differentiation toward authentic DARPP-32+ medium-sized spiny neurons. *Development* 140, 301-312.

Castiglioni, V., Onorati, M., Rochon, C., Cattaneo, E., 2012. Induced pluripotent stem cell lines from Huntington's disease mice undergo neuronal differentiation while showing alterations in the lysosomal pathway. *Neurobiology of disease* 46, 30-40.  
Cattaneo, E., Rigamonti, D., Goffredo, D., Zuccato, C., Squitieri, F., Sipione, S., 2001. Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends in neurosciences* 24, 182-188.

Chae, J.I., Kim, D.W., Lee, N., Jeon, Y.J., Jeon, I., Kwon, J., Kim, J., Soh, Y., Lee, D.S., Seo, K.S., Choi, N.J., Park, B.C., Kang, S.H., Ryu, J., Oh, S.H., Shin, D.A., Lee, D.R., Do, J.T., Park, I.H., Daley, G.Q., Song, J., 2012. Quantitative proteomic analysis of induced pluripotent stem cells derived from a human Huntington's disease patient. *The Biochemical journal* 446, 359-371.

Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., Studer, L., 2009. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature biotechnology* 27, 275-280.

Chen, F., Ma, L., Parrini, M.C., Mao, X., Lopez, M., Wu, C., Marks, P.W., Davidson, L., Kwiatkowski, D.J., Kirchhausen, T., Orkin, S.H., Rosen, F.S., Mayer, B.J., Kirschner, M.W., Alt, F.W., 2000. Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Current biology : CB* 10, 758-765.

Chenn, A., Walsh, C.A., 2002. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* 297, 365-369.

Chenn, A., Zhang, Y.A., Chang, B.T., McConnell, S.K., 1998. Intrinsic polarity of mammalian neuroepithelial cells. *Molecular and cellular neurosciences* 11, 183-193.  
Clevers, H., 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480.

Conforti, P., Camnasio, S., Mutti, C., Valenza, M., Thompson, M., Fossale, E., Zeitlin, S., MacDonald, M.E., Zuccato, C., Cattaneo, E., 2013. Lack of huntingtin promotes neural stem cells differentiation into glial cells while neurons expressing huntingtin with expanded polyglutamine tracts undergo cell death. *Neurobiology of disease* 50, 160-170.

Consortium, H.D.i., 2012. Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington's disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes. *Cell stem cell* 11, 264-278.

Conti, L., Pollard, S.M., Gorba, T., Reitano, E., Toselli, M., Biella, G., Sun, Y., Sanzone, S., Ying, Q.L., Cattaneo, E., Smith, A., 2005. Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS biology* 3, e283.

- Costa, M.R., Wen, G., Lepier, A., Schroeder, T., Gotz, M., 2008. Par-complex proteins promote proliferative progenitor divisions in the developing mouse cerebral cortex. *Development* 135, 11-22.
- Curchoe, C.L., Russo, J., Terskikh, A.V., 2012. hESC derived neuro-epithelial rosettes recapitulate early mammalian neurulation events; an in vitro model. *Stem cell research* 8, 239-246.
- Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L., Bates, G.P., 1997. Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90, 537-548.
- Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., Wichterle, H., Henderson, C.E., Eggan, K., 2008. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218-1221.
- Doe, C.Q., 2008. Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation. *Development* 135, 1575-1587.
- Dragatsis, I., Levine, M.S., Zeitlin, S., 2000. Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nature genetics* 26, 300-306.
- Dragileva, E., Hendricks, A., Teed, A., Gillis, T., Lopez, E.T., Friedberg, E.C., Kucherlapati, R., Edelman, W., Lunetta, K.L., MacDonald, M.E., Wheeler, V.C., 2009. Intergenerational and striatal CAG repeat instability in Huntington's disease knock-in mice involve different DNA repair genes. *Neurobiology of disease* 33, 37-47.
- Drubin, D.G., Nelson, W.J., 1996. Origins of cell polarity. *Cell* 84, 335-344.
- Dunah, A.W., Jeong, H., Griffin, A., Kim, Y.M., Standaert, D.G., Hersch, S.M., Mouradian, M.M., Young, A.B., Tanese, N., Krainc, D., 2002. Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science* 296, 2238-2243.
- Durr, A., Hahn-Barma, V., Brice, A., Pecheux, C., Dode, C., Feingold, J., 1999. Homozygosity in Huntington's disease. *Journal of medical genetics* 36, 172-173.
- Duyao, M.P., Auerbach, A.B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G.T., McNeil, S.M., Ge, P., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Joyner, A.L., et al., 1995. Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science* 269, 407-410.
- Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N., Ben-Yosef, D., 2007. Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell stem cell* 1, 568-577.

Elkabetz, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Socci, N.D., Tabar, V., Studer, L., 2008. Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes & development* 22, 152-165.

Esfandiari, F., Fathi, A., Gourabi, H., Kiani, S., Nemati, S., Baharvand, H., 2012. Glycogen synthase kinase-3 inhibition promotes proliferation and neuronal differentiation of human-induced pluripotent stem cell-derived neural progenitors. *Stem cells and development* 21, 3233-3243.

Etienne-Manneville, S., 2004. Cdc42--the centre of polarity. *Journal of cell science* 117, 1291-1300.

Etienne-Manneville, S., Hall, A., 2003. Cdc42 regulates GSK-3 $\beta$  and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* 421, 753-756.

Etienne-Manneville, S., Manneville, J.B., Nicholls, S., Ferenczi, M.A., Hall, A., 2005. Cdc42 and Par6-PKC $\zeta$  regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization. *The Journal of cell biology* 170, 895-901.

Fish, J.L., Dehay, C., Kennedy, H., Huttner, W.B., 2008. Making bigger brains-the evolution of neural-progenitor-cell division. *Journal of cell science* 121, 2783-2793.

Follenzi, A., Naldini, L., 2002. Generation of HIV-1 derived lentiviral vectors. *Methods in enzymology* 346, 454-465.

Fox, J.H., Connor, T., Chopra, V., Dorsey, K., Kama, J.A., Bleckmann, D., Betschart, C., Hoyer, D., Frentzel, S., Difiglia, M., Paganetti, P., Hersch, S.M., 2010. The mTOR kinase inhibitor Everolimus decreases S6 kinase phosphorylation but fails to reduce mutant huntingtin levels in brain and is not neuroprotective in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Molecular neurodegeneration* 5, 26.

Freese, J.L., Pino, D., Pleasure, S.J., 2010. Wnt signaling in development and disease. *Neurobiology of disease* 38, 148-153.

Fukata, M., Kaibuchi, K., 2001. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2, 887-897.

Fukuhara, T., Shimizu, K., Kawakatsu, T., Fukuyama, T., Minami, Y., Honda, T., Hoshino, T., Yamada, T., Ogita, H., Okada, M., Takai, Y., 2004. Activation of Cdc42 by trans interactions of the cell adhesion molecules nectins through c-Src and Cdc42-GEF FRG. *The Journal of cell biology* 166, 393-405.

Fusco, F.R., Chen, Q., Lamoreaux, W.J., Figueredo-Cardenas, G., Jiao, Y., Coffman, J.A., Surmeier, D.J., Honig, M.G., Carlock, L.R., Reiner, A., 1999. Cellular localization of huntingtin in striatal and cortical neurons in rats: lack of correlation with neuronal vulnerability in Huntington's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 1189-1202.

Gammill, L.S., Bronner-Fraser, M., 2003. Neural crest specification: migrating into genomics. *Nature reviews. Neuroscience* 4, 795-805.

Garrard, S.M., Capaldo, C.T., Gao, L., Rosen, M.K., Macara, I.G., Tomchick, D.R., 2003. Structure of Cdc42 in a complex with the GTPase-binding domain of the cell polarity protein, Par6. *The EMBO journal* 22, 1125-1133.

Gauthier, L.R., Charrin, B.C., Borrell-Pages, M., Dompierre, J.P., Rangone, H., Cordelieres, F.P., De Mey, J., MacDonald, M.E., Lessmann, V., Humbert, S., Saudou, F., 2004. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118, 127-138.

Germain, N., Banda, E., Grabel, L., 2010. Embryonic stem cell neurogenesis and neural specification. *Journal of cellular biochemistry* 111, 535-542.

Gervais, F.G., Singaraja, R., Xanthoudakis, S., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., Metzler, M., Hackam, A.S., Tam, J., Vaillancourt, J.P., Houtzager, V., Rasper, D.M., Roy, S., Hayden, M.R., Nicholson, D.W., 2002. Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hip1. *Nature cell biology* 4, 95-105.

Ghosh, S., Marquardt, T., Thaler, J.P., Carter, N., Andrews, S.E., Pfaff, S.L., Hunter, T., 2008. Instructive role of aPKC $\zeta$  subcellular localization in the assembly of adherens junctions in neural progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 335-340.

Godin, J.D., Colombo, K., Molina-Calavita, M., Keryer, G., Zala, D., Charrin, B.C., Dietrich, P., Volvert, M.L., Guillemot, F., Dragatsis, I., Bellaiche, Y., Saudou, F., Nguyen, L., Humbert, S., 2010. Huntingtin is required for mitotic spindle orientation and mammalian neurogenesis. *Neuron* 67, 392-406.

Godin, J.D., Humbert, S., 2011. Mitotic spindle: focus on the function of huntingtin. *The international journal of biochemistry & cell biology* 43, 852-856.

Goetze, B., Tuebing, F., Xie, Y., Dorostkar, M.M., Thomas, S., Pehl, U., Boehm, S., Macchi, P., Kiebler, M.A., 2006. The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2 is required for dendritic spine morphogenesis. *The Journal of cell biology* 172, 221-231.

Goldstein, B., Macara, I.G., 2007. The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Developmental cell* 13, 609-622.

Gonitel, R., Moffitt, H., Sathasivam, K., Woodman, B., Detloff, P.J., Faull, R.L., Bates, G.P., 2008. DNA instability in postmitotic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 3467-3472.

Gopalakrishnan, S., Hallett, M.A., Atkinson, S.J., Marrs, J.A., 2007. aPKC-PAR complex dysfunction and tight junction disassembly in renal epithelial cells during ATP depletion. *American journal of physiology. Cell physiology* 292, C1094-1102.

Gotz, M., Huttner, W.B., 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 777-788.



Graybill, C., Wee, B., Atwood, S.X., Prehoda, K.E., 2012. Partitioning-defective protein 6 (Par-6) activates atypical protein kinase C (aPKC) by pseudosubstrate displacement. *The Journal of biological chemistry* 287, 21003-21011.

Guilgur, L.G., Prudencio, P., Ferreira, T., Pimenta-Marques, A.R., Martinho, R.G., 2012. *Drosophila* aPKC is required for mitotic spindle orientation during symmetric division of epithelial cells. *Development* 139, 503-513.

Guillemot, F., 2007. Cell fate specification in the mammalian telencephalon. *Progress in neurobiology* 83, 37-52.

Gutekunst, C.A., Levey, A.I., Heilman, C.J., Whaley, W.L., Yi, H., Nash, N.R., Rees, H.D., Madden, J.J., Hersch, S.M., 1995. Identification and localization of huntingtin in brain and human lymphoblastoid cell lines with anti-fusion protein antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8710-8714.

Hackam, A.S., Yassa, A.S., Singaraja, R., Metzler, M., Gutekunst, C.A., Gan, L., Warby, S., Wellington, C.L., Vaillancourt, J., Chen, N., Gervais, F.G., Raymond, L., Nicholson, D.W., Hayden, M.R., 2000. Huntingtin interacting protein 1 induces apoptosis via a novel caspase-dependent death effector domain. *The Journal of biological chemistry* 275, 41299-41308.

Haubst, N., Georges-Labouesse, E., De Arcangelis, A., Mayer, U., Gotz, M., 2006. Basement membrane attachment is dispensable for radial glial cell fate and for proliferation, but affects positioning of neuronal subtypes. *Development* 133, 3245-3254.

Henshall, T.L., Tucker, B., Lumsden, A.L., Nornes, S., Lardelli, M.T., Richards, R.I., 2009. Selective neuronal requirement for huntingtin in the developing zebrafish. *Human molecular genetics* 18, 4830-4842.

Hirabayashi, Y., Gotoh, Y., 2005. Stage-dependent fate determination of neural precursor cells in mouse forebrain. *Neuroscience research* 51, 331-336.

Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N., Gotoh, Y., 2004. The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* 131, 2791-2801.

Hirose, T., Izumi, Y., Nagashima, Y., Tamai-Nagai, Y., Kurihara, H., Sakai, T., Suzuki, Y., Yamanaka, T., Suzuki, A., Mizuno, K., Ohno, S., 2002. Involvement of ASIP/PAR-3 in the promotion of epithelial tight junction formation. *Journal of cell science* 115, 2485-2495.

Ho, L.W., Brown, R., Maxwell, M., Wyttenbach, A., Rubinsztein, D.C., 2001. Wild type Huntingtin reduces the cellular toxicity of mutant Huntingtin in mammalian cell models of Huntington's disease. *Journal of medical genetics* 38, 450-452.

Hu, B.Y., Weick, J.P., Yu, J., Ma, L.X., Zhang, X.Q., Thomson, J.A., Zhang, S.C., 2010. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows

developmental principles but with variable potency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 4335-4340.

Hur, E.M., Zhou, F.Q., 2010. GSK3 signalling in neural development. *Nature reviews. Neuroscience* 11, 539-551.

Hutterer, A., Betschinger, J., Petronczki, M., Knoblich, J.A., 2004. Sequential roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the establishment of epithelial polarity during *Drosophila* embryogenesis. *Developmental cell* 6, 845-854.

Huttner, W.B., Brand, M., 1997. Asymmetric division and polarity of neuroepithelial cells. *Current opinion in neurobiology* 7, 29-39.

Iden, S., Collard, J.G., 2008. Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 846-859.

Ikeda, W., Nakanishi, H., Miyoshi, J., Mandai, K., Ishizaki, H., Tanaka, M., Togawa, A., Takahashi, K., Nishioka, H., Yoshida, H., Mizoguchi, A., Nishikawa, S., Takai, Y., 1999. Afadin: A key molecule essential for structural organization of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis. *The Journal of cell biology* 146, 1117-1132.

Imai, F., Hirai, S., Akimoto, K., Koyama, H., Miyata, T., Ogawa, M., Noguchi, S., Sasaoka, T., Noda, T., Ohno, S., 2006. Inactivation of aPKC $\lambda$  results in the loss of adherens junctions in neuroepithelial cells without affecting neurogenesis in mouse neocortex. *Development* 133, 1735-1744.

Israsena, N., Hu, M., Fu, W., Kan, L., Kessler, J.A., 2004. The presence of FGF2 signaling determines whether beta-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells. *Developmental biology* 268, 220-231.

Ivanova, N.B., Dimos, J.T., Schaniel, C., Hackney, J.A., Moore, K.A., Lemischka, I.R., 2002. A stem cell molecular signature. *Science* 298, 601-604.

Jana, N.R., Zemskov, E.A., Wang, G., Nukina, N., 2001. Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *Human molecular genetics* 10, 1049-1059.

Jeon, I., Lee, N., Li, J.Y., Park, I.H., Park, K.S., Moon, J., Shim, S.H., Choi, C., Chang, D.J., Kwon, J., Oh, S.H., Shin, D.A., Kim, H.S., Do, J.T., Lee, D.R., Kim, M., Kang, K.S., Daley, G.Q., Brundin, P., Song, J., 2012. Neuronal properties, in vivo effects, and pathology of a Huntington's disease patient-derived induced pluripotent stem cells. *Stem cells* 30, 2054-2062.

Johnson, D.I., 1999. Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 63, 54-105.

Jolly, L.A., Taylor, V., Wood, S.A., 2009. USP9X enhances the polarity and self-renewal of embryonic stem cell-derived neural progenitors. *Molecular biology of the cell* 20, 2015-2029.

Juopperi, T.A., Kim, W.R., Chiang, C.H., Yu, H., Margolis, R.L., Ross, C.A., Ming, G.L., Song, H., 2012. Astrocytes generated from patient induced pluripotent stem cells recapitulate features of Huntington's disease patient cells. *Molecular brain* 5, 17.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., Yoshimori, T., 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal* 19, 5720-5728.

Kadowaki, M., Nakamura, S., Machon, O., Krauss, S., Radice, G.L., Takeichi, M., 2007. N-cadherin mediates cortical organization in the mouse brain. *Developmental biology* 304, 22-33.

Kegel, K.B., Kim, M., Sapp, E., McIntyre, C., Castano, J.G., Aronin, N., DiFiglia, M., 2000. Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 7268-7278.

Kegel, K.B., Meloni, A.R., Yi, Y., Kim, Y.J., Doyle, E., Cuiffo, B.G., Sapp, E., Wang, Y., Qin, Z.H., Chen, J.D., Nevins, J.R., Aronin, N., DiFiglia, M., 2002. Huntingtin is present in the nucleus, interacts with the transcriptional corepressor C-terminal binding protein, and represses transcription. *The Journal of biological chemistry* 277, 7466-7476.

Keith, D., El-Husseini, A., 2008. Excitation Control: Balancing PSD-95 Function at the Synapse. *Frontiers in molecular neuroscience* 1, 4.

Kennedy, L., Evans, E., Chen, C.M., Craven, L., Detloff, P.J., Ennis, M., Shelbourne, P.F., 2003. Dramatic tissue-specific mutation length increases are an early molecular event in Huntington disease pathogenesis. *Human molecular genetics* 12, 3359-3367.

Kiebler, M.A., Hemraj, I., Verkade, P., Kohrmann, M., Fortes, P., Marion, R.M., Ortin, J., Dotti, C.G., 1999. The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 288-297.

Kim, D., Kim, C.H., Moon, J.I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., Kim, K.S., 2009a. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell stem cell* 4, 472-476.

Kim, E.Y., Jeon, K., Park, H.Y., Han, Y.J., Yang, B.C., Park, S.B., Chung, H.M., Park, S.P., 2010a. Differences between cellular and molecular profiles of induced pluripotent stem cells generated from mouse embryonic fibroblasts. *Cellular reprogramming* 12, 627-639.

- Kim, H., Lee, G., Ganat, Y., Papapetrou, E.P., Lipchina, I., Socci, N.D., Sadelain, M., Studer, L., 2011. miR-371-3 expression predicts neural differentiation propensity in human pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 8, 695-706.
- Kim, S., Lehtinen, M.K., Sessa, A., Zappaterra, M.W., Cho, S.H., Gonzalez, D., Boggan, B., Austin, C.A., Wijnholds, J., Gambello, M.J., Malicki, J., LaMantia, A.S., Broccoli, V., Walsh, C.A., 2010b. The apical complex couples cell fate and cell survival to cerebral cortical development. *Neuron* 66, 69-84.
- Kim, S.H., Li, Z., Sacks, D.B., 2000. E-cadherin-mediated cell-cell attachment activates Cdc42. *The Journal of biological chemistry* 275, 36999-37005.
- Kim, W.Y., Snider, W.D., 2011. Functions of GSK-3 Signaling in Development of the Nervous System. *Frontiers in molecular neuroscience* 4, 44.
- Kim, W.Y., Wang, X., Wu, Y., Doble, B.W., Patel, S., Woodgett, J.R., Snider, W.D., 2009b. GSK-3 is a master regulator of neural progenitor homeostasis. *Nature neuroscience* 12, 1390-1397.
- Kim, Y.J., Yi, Y., Sapp, E., Wang, Y., Cuiffo, B., Kegel, K.B., Qin, Z.H., Aronin, N., DiFiglia, M., 2001. Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 12784-12789.
- Knoblich, J.A., 2008. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* 132, 583-597.
- Kosodo, Y., Roper, K., Haubensak, W., Marzesco, A.M., Corbeil, D., Huttner, W.B., 2004. Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *The EMBO journal* 23, 2314-2324.
- Kusek, G., Campbell, M., Doyle, F., Tenenbaum, S.A., Kiebler, M., Temple, S., 2012. Asymmetric segregation of the double-stranded RNA binding protein Staufen2 during mammalian neural stem cell divisions promotes lineage progression. *Cell stem cell* 11, 505-516.
- Laprise, P., Chailier, P., Houde, M., Beaulieu, J.F., Boucher, M.J., Rivard, N., 2002. Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *The Journal of biological chemistry* 277, 8226-8234.
- Lee, C.Y., Robinson, K.J., Doe, C.Q., 2006. Lgl, Pins and aPKC regulate neuroblast self-renewal versus differentiation. *Nature* 439, 594-598.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B., McKay, R.D., 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585-595.
- Li, H., Wyman, T., Yu, Z.X., Li, S.H., Li, X.J., 2003. Abnormal association of mutant huntingtin with synaptic vesicles inhibits glutamate release. *Human molecular genetics* 12, 2021-2030.

- Li, S.H., Cheng, A.L., Zhou, H., Lam, S., Rao, M., Li, H., Li, X.J., 2002. Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. *Molecular and cellular biology* 22, 1277-1287.
- Liang, Q., Ouyang, X., Schneider, L., Zhang, J., 2011. Reduction of mutant huntingtin accumulation and toxicity by lysosomal cathepsins D and B in neurons. *Molecular neurodegeneration* 6, 37.
- Lin, D., Edwards, A.S., Fawcett, J.P., Mbamalu, G., Scott, J.D., Pawson, T., 2000. A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nature cell biology* 2, 540-547.
- Lo Sardo, V., Zuccato, C., Gaudenzi, G., Vitali, B., Ramos, C., Tartari, M., Myre, M.A., Walker, J.A., Pistocchi, A., Conti, L., Valenza, M., Drung, B., Schmidt, B., Gusella, J., Zeitlin, S., Cotelli, F., Cattaneo, E., 2012. An evolutionary recent neuroepithelial cell adhesion function of huntingtin implicates ADAM10-Ncadherin. *Nature neuroscience* 15, 713-721.
- Lombardo, A., Genovese, P., Beausejour, C.M., Colleoni, S., Lee, Y.L., Kim, K.A., Ando, D., Urnov, F.D., Galli, C., Gregory, P.D., Holmes, M.C., Naldini, L., 2007. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nature biotechnology* 25, 1298-1306.
- Lorincz, M.T., Zawistowski, V.A., 2009. Expanded CAG repeats in the murine Huntington's disease gene increases neuronal differentiation of embryonic and neural stem cells. *Molecular and cellular neurosciences* 40, 1-13.
- Macara, I.G., 2004. Parsing the polarity code. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5, 220-231.
- Machon, O., van den Bout, C.J., Backman, M., Kemler, R., Krauss, S., 2003. Role of beta-catenin in the developing cortical and hippocampal neuroepithelium. *Neuroscience* 122, 129-143.
- Maherali, N., Hochedlinger, K., 2008. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 3, 595-605.
- Malatesta, P., Gotz, M., 2013. Radial glia - from boring cables to stem cell stars. *Development* 140, 483-486.
- Marthiens, V., ffrench-Constant, C., 2009. Adherens junction domains are split by asymmetric division of embryonic neural stem cells. *EMBO reports* 10, 515-520.
- Martin-Belmonte, F., Perez-Moreno, M., 2012. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nature reviews. Cancer* 12, 23-38.
- Martinez-Vicente, M., Tallozy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., de Vries, R., Arias, E., Harris, S., Sulzer, D., Cuervo, A.M., 2010. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nature neuroscience* 13, 567-576.

- Marullo, M., Zuccato, C., Mariotti, C., Lahiri, N., Tabrizi, S.J., Di Donato, S., Cattaneo, E., 2010. Expressed Alu repeats as a novel, reliable tool for normalization of real-time quantitative RT-PCR data. *Genome biology* 11, R9.
- Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., Van Steirteghem, A., 2006. Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Human reproduction* 21, 503-511.
- Megason, S.G., McMahon, A.P., 2002. A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development* 129, 2087-2098.
- Melendez, J., Grogg, M., Zheng, Y., 2011. Signaling role of Cdc42 in regulating mammalian physiology. *The Journal of biological chemistry* 286, 2375-2381.
- Michel, D., Arsanto, J.P., Massey-Harroche, D., Beclin, C., Wijnholds, J., Le Bivic, A., 2005. PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells. *Journal of cell science* 118, 4049-4057.
- Miller, J.R., 2002. The Wnts. *Genome biology* 3, REVIEWS3001.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T., Ogawa, M., 2004. Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131, 3133-3145.
- Miyoshi, J., Takai, Y., 2005. Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Advanced drug delivery reviews* 57, 815-855.
- Mizuno, K., Ohno, S., 2006. [Regulation of epithelial cell polarity mediated by aPKC-PAR complex]. *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme* 51, 782-788.
- Molero, A.E., Gokhan, S., Gonzalez, S., Feig, J.L., Alexandre, L.C., Mehler, M.F., 2009. Impairment of developmental stem cell-mediated striatal neurogenesis and pluripotency genes in a knock-in model of Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 21900-21905.
- Moscat, J., Diaz-Meco, M.T., Albert, A., Campuzano, S., 2006. Cell signaling and function organized by PB1 domain interactions. *Molecular cell* 23, 631-640.
- Muhlau, M., Winkelmann, J., Rujescu, D., Giegling, I., Koutsouleris, N., Gaser, C., Arsic, M., Weindl, A., Reiser, M., Meisenzahl, E.M., 2012. Variation within the Huntington's disease gene influences normal brain structure. *PloS one* 7, e29809.
- Musch, A., Cohen, D., Yeaman, C., Nelson, W.J., Rodriguez-Boulan, E., Brennwald, P.J., 2002. Mammalian homolog of Drosophila tumor suppressor lethal (2) giant larvae interacts with basolateral exocytic machinery in Madin-Darby canine kidney cells. *Molecular biology of the cell* 13, 158-168.

- Nakagawa, M., Fukata, M., Yamaga, M., Itoh, N., Kaibuchi, K., 2001. Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *Journal of cell science* 114, 1829-1838.
- Nasir, J., Floresco, S.B., O'Kusky, J.R., Diewert, V.M., Richman, J.M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J.D., Phillips, A.G., Hayden, M.R., 1995. Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell* 81, 811-823.
- Navarro, C., Nola, S., Audebert, S., Santoni, M.J., Arsanto, J.P., Ginestier, C., Marchetto, S., Jacquemier, J., Isnardon, D., Le Bivic, A., Birnbaum, D., Borg, J.P., 2005. Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. *Oncogene* 24, 4330-4339.
- Nelson, W.J., 2003. Epithelial cell polarity from the outside looking in. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* 18, 143-146.
- Nelson, W.J., Hammerton, R.W., 1989. A membrane-cytoskeletal complex containing Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, ankyrin, and fodrin in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells: implications for the biogenesis of epithelial cell polarity. *The Journal of cell biology* 108, 893-902.
- Nelson, W.J., Nusse, R., 2004. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303, 1483-1487.
- Niclis, J., Trounson, A.O., Dottori, M., Ellisdon, A., Bottomley, S.P., Verlinsky, Y., Cram, D., 2009. Human embryonic stem cell models of Huntington disease. *Reproductive biomedicine online* 19, 106-113.
- Nishihara, S., Tsuda, L., Ogura, T., 2003. The canonical Wnt pathway directly regulates NR5F/REST expression in chick spinal cord. *Biochemical and biophysical research communications* 311, 55-63.
- Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., Kriegstein, A.R., 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature neuroscience* 7, 136-144.
- Noda, Y., Takeya, R., Ohno, S., Naito, S., Ito, T., Sumimoto, H., 2001. Human homologues of the *Caenorhabditis elegans* cell polarity protein PAR6 as an adaptor that links the small GTPases Rac and Cdc42 to atypical protein kinase C. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 6, 107-119.
- Noren, N.K., Niessen, C.M., Gumbiner, B.M., Burridge, K., 2001. Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. *The Journal of biological chemistry* 276, 33305-33308.
- Nucifora, F.C., Jr., Sasaki, M., Peters, M.F., Huang, H., Cooper, J.K., Yamada, M., Takahashi, H., Tsuji, S., Troncoso, J., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Ross, C.A., 2001.

Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 291, 2423-2428.

Okita, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S., 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317.

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., Yamanaka, S., 2008. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322, 949-953.

Osafune, K., Caron, L., Borowiak, M., Martinez, R.J., Fitz-Gerald, C.S., Sato, Y., Cowan, C.A., Chien, K.R., Melton, D.A., 2008. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nature biotechnology* 26, 313-315.

Pandur, P., Kuhl, M., 2001. An arrow for wingless to take-off. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 23, 207-210.

Park, I.H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., Daley, G.Q., 2008. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877-886.

Parker, J.A., Metzler, M., Georgiou, J., Mage, M., Roder, J.C., Rose, A.M., Hayden, M.R., Neri, C., 2007. Huntingtin-interacting protein 1 influences worm and mouse presynaptic function and protects *Caenorhabditis elegans* neurons against mutant polyglutamine toxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 11056-11064.

Pearson, C.E., Nichol Edamura, K., Cleary, J.D., 2005. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nature reviews. Genetics* 6, 729-742.

Peyre, E., Morin, X., 2012. An oblique view on the role of spindle orientation in vertebrate neurogenesis. *Development, growth & differentiation* 54, 287-305.

Pickering, S.J., Minger, S.L., Patel, M., Taylor, H., Black, C., Burns, C.J., Ekonomou, A., Braude, P.R., 2005. Generation of a human embryonic stem cell line encoding the cystic fibrosis mutation deltaF508, using preimplantation genetic diagnosis. *Reproductive biomedicine online* 10, 390-397.

Pierce, G.B., Bullock, W.K., Huntington, R.W., Jr., 1970. Yolk sac tumors of the testis. *Cancer* 25, 644-658.

Plant, P.J., Fawcett, J.P., Lin, D.C., Holdorf, A.D., Binns, K., Kulkarni, S., Pawson, T., 2003. A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. *Nature cell biology* 5, 301-308.

Prevedello, D.M., Kassam, A.B., Carrau, R.L., Snyderman, C.H., Thomas, A., Gardner, P., Mintz, A., Vecchione, L., Losee, J., 2007. Transpalatal endoscopic endonasal resection of a giant epignathus skull base teratoma in a newborn. Case report. *Journal of neurosurgery* 107, 266-271.



Qin, Y., Capaldo, C., Gumbiner, B.M., Macara, I.G., 2005. The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin. *The Journal of cell biology* 171, 1061-1071.

Rakic, P., 1995. A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends in neurosciences* 18, 383-388.

Ramalho-Santos, M., Yoon, S., Matsuzaki, Y., Mulligan, R.C., Melton, D.A., 2002. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science* 298, 597-600.

Ravikumar, B., Rubinsztein, D.C., 2006. Role of autophagy in the clearance of mutant huntingtin: a step towards therapy? *Molecular aspects of medicine* 27, 520-527.

Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Oroz, L.G., Scaravilli, F., Easton, D.F., Duden, R., O'Kane, C.J., Rubinsztein, D.C., 2004. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature genetics* 36, 585-595.

Reddy, P.H., Williams, M., Charles, V., Garrett, L., Pike-Buchanan, L., Whetsell, W.O., Jr., Miller, G., Tagle, D.A., 1998. Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA. *Nature genetics* 20, 198-202.

Reiner, A., Albin, R.L., Anderson, K.D., D'Amato, C.J., Penney, J.B., Young, A.B., 1988. Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 5733-5737.

Reiner, A., Del Mar, N., Meade, C.A., Yang, H., Dragatsis, I., Zeitlin, S., Goldowitz, D., 2001. Neurons lacking huntingtin differentially colonize brain and survive in chimeric mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 7608-7619.

Rigamonti, D., Bauer, J.H., De-Fraja, C., Conti, L., Sipione, S., Sciorati, C., Clementi, E., Hackam, A., Hayden, M.R., Li, Y., Cooper, J.K., Ross, C.A., Govoni, S., Vincenz, C., Cattaneo, E., 2000. Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20, 3705-3713.

Robinton, D.A., Daley, G.Q., 2012. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481, 295-305.

Rodriguez-Boulán, E., Nelson, W.J., 1989. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* 245, 718-725.

Roh, M.H., Makarova, O., Liu, C.J., Shin, K., Lee, S., Laurinec, S., Goyal, M., Wiggins, R., Margolis, B., 2002. The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *The Journal of cell biology* 157, 161-172.

Sapp, E., Schwarz, C., Chase, K., Bhide, P.G., Young, A.B., Penney, J., Vonsattel, J.P., Aronin, N., DiFiglia, M., 1997. Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Annals of neurology* 42, 604-612.

Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., Banfi, S., Parenti, G., Cattaneo, E., Ballabio, A., 2009. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 325, 473-477.

Sawada, M., Sawamoto, K., 2013. Mechanisms of neurogenesis in the normal and injured adult brain. *The Keio journal of medicine* 62, 13-28.

Seriola, A., Spits, C., Simard, J.P., Hilven, P., Haentjens, P., Pearson, C.E., Sermon, K., 2011. Huntington's and myotonic dystrophy hESCs: down-regulated trinucleotide repeat instability and mismatch repair machinery expression upon differentiation. *Human molecular genetics* 20, 176-185.

Sharp, A.H., Loev, S.J., Schilling, G., Li, S.H., Li, X.J., Bao, J., Wagster, M.V., Kotzuk, J.A., Steiner, J.P., Lo, A., et al., 1995. Widespread expression of Huntington's disease gene (IT15) protein product. *Neuron* 14, 1065-1074.

Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., Robinson, H.P., Livesey, F.J., 2012. Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nature neuroscience* 15, 477-486, S471.

Shimohata, T., Nakajima, T., Yamada, M., Uchida, C., Onodera, O., Naruse, S., Kimura, T., Koide, R., Nozaki, K., Sano, Y., Ishiguro, H., Sakoe, K., Ooshima, T., Sato, A., Ikeuchi, T., Oyake, M., Sato, T., Aoyagi, Y., Hozumi, I., Nagatsu, T., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Goto, J., Kanazawa, I., Davidson, I., Tanese, N., Takahashi, H., Tsuji, S., 2000. Expanded polyglutamine stretches interact with TAFII130, interfering with CREB-dependent transcription. *Nature genetics* 26, 29-36.

Shin, K., Straight, S., Margolis, B., 2005. PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. *The Journal of cell biology* 168, 705-711.

Sidman, R.L., Rakic, P., 1973. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain research* 62, 1-35.

Sipione, S., Rigamonti, D., Valenza, M., Zuccato, C., Conti, L., Pritchard, J., Kooperberg, C., Olson, J.M., Cattaneo, E., 2002. Early transcriptional profiles in huntingtin-inducible striatal cells by microarray analyses. *Human molecular genetics* 11, 1953-1965.

Smith, R., Brundin, P., Li, J.Y., 2005. Synaptic dysfunction in Huntington's disease: a new perspective. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62, 1901-1912.

Sommer, C.A., Sommer, A.G., Longmire, T.A., Christodoulou, C., Thomas, D.D., Gostissa, M., Alt, F.W., Murphy, G.J., Kotton, D.N., Mostoslavsky, G., 2010. Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem cells* 28, 64-74.

Sommer, C.A., Stadtfeld, M., Murphy, G.J., Hochedlinger, K., Kotton, D.N., Mostoslavsky, G., 2009. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem cells* 27, 543-549.

Song, C., Zhang, Y., Parsons, C.G., Liu, Y.F., 2003. Expression of polyglutamine-expanded huntingtin induces tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of biological chemistry* 278, 33364-33369.

Sotillos, S., Diaz-Meco, M.T., Caminero, E., Moscat, J., Campuzano, S., 2004. DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in *Drosophila*. *The Journal of cell biology* 166, 549-557.

Squitieri, F., Gellera, C., Cannella, M., Mariotti, C., Cislighi, G., Rubinsztein, D.C., Almqvist, E.W., Turner, D., Bachoud-Levi, A.C., Simpson, S.A., Delatycki, M., Maglione, V., Hayden, M.R., Donato, S.D., 2003. Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. *Brain : a journal of neurology* 126, 946-955.

Srinivasan, K., Roosa, J., Olsen, O., Lee, S.H., Bredt, D.S., McConnell, S.K., 2008. MALS-3 regulates polarity and early neurogenesis in the developing cerebral cortex. *Development* 135, 1781-1790.

Stadeli, R., Hoffmans, R., Basler, K., 2006. Transcription under the control of nuclear Arm/beta-catenin. *Current biology : CB* 16, R378-385.

Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., Hochedlinger, K., 2008. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945-949.

Steffan, J.S., Bodai, L., Pallos, J., Poelman, M., McCampbell, A., Apostol, B.L., Kazantsev, A., Schmidt, E., Zhu, Y.Z., Greenwald, M., Kurokawa, R., Housman, D.E., Jackson, G.R., Marsh, J.L., Thompson, L.M., 2001. Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413, 739-743.

Straight, S.W., Shin, K., Fogg, V.C., Fan, S., Liu, C.J., Roh, M., Margolis, B., 2004. Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects. *Molecular biology of the cell* 15, 1981-1990.

Sun, Y., Savanenin, A., Reddy, P.H., Liu, Y.F., 2001. Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *The Journal of biological chemistry* 276, 24713-24718.

Suzuki, A., Ohno, S., 2006. The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *Journal of cell science* 119, 979-987.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.

Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.

Takemoto, T., Uchikawa, M., Kamachi, Y., Kondoh, H., 2006. Convergence of Wnt and FGF signals in the genesis of posterior neural plate through activation of the Sox2 enhancer N-1. *Development* 133, 297-306.

Taverna, E., Huttner, W.B., 2010. Neural progenitor nuclei IN motion. *Neuron* 67, 906-914.

Tong, Y., Ha, T.J., Liu, L., Nishimoto, A., Reiner, A., Goldowitz, D., 2011. Spatial and temporal requirements for huntingtin (Htt) in neuronal migration and survival during brain development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 14794-14799.

Trushina, E., Dyer, R.B., Badger, J.D., 2nd, Ure, D., Eide, L., Tran, D.D., Vrieze, B.T., Legendre-Guillemain, V., McPherson, P.S., Mandavilli, B.S., Van Houten, B., Zeitlin, S., McNiven, M., Aebersold, R., Hayden, M., Parisi, J.E., Seeberg, E., Dragatsis, I., Doyle, K., Bender, A., Chacko, C., McMurray, C.T., 2004. Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Molecular and cellular biology* 24, 8195-8209.

Tzeng, S.F., Wu, J.P., 1999. Responses of microglia and neural progenitors to mechanical brain injury. *Neuroreport* 10, 2287-2292.

Velier, J., Kim, M., Schwarz, C., Kim, T.W., Sapp, E., Chase, K., Aronin, N., DiFiglia, M., 1998. Wild-type and mutant huntingtins function in vesicle trafficking in the secretory and endocytic pathways. *Experimental neurology* 152, 34-40.

Verlinsky, Y., Strelchenko, N., Kukhareno, V., Rechitsky, S., Verlinsky, O., Galat, V., Kuliev, A., 2005. Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reproductive biomedicine online* 10, 105-110.

Vessey, J.P., Amadei, G., Burns, S.E., Kiebler, M.A., Kaplan, D.R., Miller, F.D., 2012. An asymmetrically localized Staufen2-dependent RNA complex regulates maintenance of mammalian neural stem cells. *Cell stem cell* 11, 517-528.

Viti, J., Gulacsi, A., Lillien, L., 2003. Wnt regulation of progenitor maturation in the cortex depends on Shh or fibroblast growth factor 2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 5919-5927.

Wang, Q., Chen, X.W., Margolis, B., 2007. PALS1 regulates E-cadherin trafficking in mammalian epithelial cells. *Molecular biology of the cell* 18, 874-885.

Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., Daley, G.Q., Brack, A.S., Collins, J.J., Cowan, C., Schlaeger, T.M., Rossi, D.J., 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell stem cell* 7, 618-630.

Wellington, C.L., Hayden, M.R., 2000. Caspases and neurodegeneration: on the cutting edge of new therapeutic approaches. *Clinical genetics* 57, 1-10.

- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., 2007. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318-324.
- Wexler, N.S., Young, A.B., Tanzi, R.E., Travers, H., Starosta-Rubinstein, S., Penney, J.B., Snodgrass, S.R., Shoulson, I., Gomez, F., Ramos Arroyo, M.A., et al., 1987. Homozygotes for Huntington's disease. *Nature* 326, 194-197.
- White, J.K., Auerbach, W., Duyao, M.P., Vonsattel, J.P., Gusella, J.F., Joyner, A.L., MacDonald, M.E., 1997. Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nature genetics* 17, 404-410.
- Wodarz, A., Huttner, W.B., 2003. Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates. *Mechanisms of development* 120, 1297-1309.
- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hamalainen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., Kaji, K., Sung, H.K., Nagy, A., 2009. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766-770.
- Wood, H.B., Episkopou, V., 1999. Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages. *Mechanisms of development* 86, 197-201.
- Wood, J.D., MacMillan, J.C., Harper, P.S., Lowenstein, P.R., Jones, A.L., 1996. Partial characterisation of murine huntingtin and apparent variations in the subcellular localisation of huntingtin in human, mouse and rat brain. *Human molecular genetics* 5, 481-487.
- Wu, X., Li, S., Chrostek-Grashoff, A., Czuchra, A., Meyer, H., Yurchenco, P.D., Brakebusch, C., 2007. Cdc42 is crucial for the establishment of epithelial polarity during early mammalian development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236, 2767-2778.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T., Iwamatsu, A., Shinohara, A., Ohno, S., 2003. Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Current biology : CB* 13, 734-743.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Kitamura, K., Maniwa, R., Nagai, Y., Yamashita, A., Hirose, T., Ishikawa, H., Ohno, S., 2001. PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 6, 721-731.
- Ying, Q.L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., Smith, A., 2003. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nature biotechnology* 21, 183-186.

Ying, Q.L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., Smith, A., 2008. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453, 519-523.

Yokota, Y., Eom, T.Y., Stanco, A., Kim, W.Y., Rao, S., Snider, W.D., Anton, E.S., 2010. Cdc42 and Gsk3 modulate the dynamics of radial glial growth, inter-radial glial interactions and polarity in the developing cerebral cortex. *Development* 137, 4101-4110.

Yoon, S.R., Dubeau, L., de Young, M., Wexler, N.S., Arnheim, N., 2003. Huntington disease expansion mutations in humans can occur before meiosis is completed. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8834-8838.

Yu, D.X., Marchetto, M.C., Gage, F.H., 2013. Therapeutic translation of iPSCs for treating neurological disease. *Cell stem cell* 12, 678-688.

Yu, F., Kuo, C.T., Jan, Y.N., 2006. Drosophila neuroblast asymmetric cell division: recent advances and implications for stem cell biology. *Neuron* 51, 13-20.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, II, Thomson, J.A., 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.

Yusa, K., Rad, R., Takeda, J., Bradley, A., 2009. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nature methods* 6, 363-369.

Zechner, D., Fujita, Y., Hulsken, J., Muller, T., Walther, I., Taketo, M.M., Crenshaw, E.B., 3rd, Birchmeier, W., Birchmeier, C., 2003. beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system. *Developmental biology* 258, 406-418.

Zeitlin, S., Liu, J.P., Chapman, D.L., Papaioannou, V.E., Efstratiadis, A., 1995. Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue. *Nature genetics* 11, 155-163.

Zhadanov, A.B., Provance, D.W., Jr., Speer, C.A., Coffin, J.D., Goss, D., Blixt, J.A., Reichert, C.M., Mercer, J.A., 1999. Absence of the tight junctional protein AF-6 disrupts epithelial cell-cell junctions and cell polarity during mouse development. *Current biology : CB* 9, 880-888.

Zhang, N., An, M.C., Montoro, D., Ellerby, L.M., 2010. Characterization of Human Huntington's Disease Cell Model from Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS currents* 2, RRN1193.

Zhang, Y., Leavitt, B.R., van Raamsdonk, J.M., Dragatsis, I., Goldowitz, D., MacDonald, M.E., Hayden, M.R., Friedlander, R.M., 2006. Huntingtin inhibits caspase-3 activation. *The EMBO journal* 25, 5896-5906.

Zhou, W., Freed, C.R., 2009. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem cells* 27, 2667-2674.

Zuccato, C., Cattaneo, E., 2007. Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Progress in neurobiology* 81, 294-330.

Zuccato, C., Ciammola, A., Rigamonti, D., Leavitt, B.R., Goffredo, D., Conti, L., MacDonald, M.E., Friedlander, R.M., Silani, V., Hayden, M.R., Timmusk, T., Sipione, S., Cattaneo, E., 2001. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293, 493-498.

Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, L., Cataudella, T., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Timmusk, T., Rigamonti, D., Cattaneo, E., 2003. Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nature genetics* 35, 76-83.

Zuccato, C., Valenza, M., Cattaneo, E., 2010. Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiological reviews* 90, 905-981.

Zynger, D.L., McCallum, J.C., Luan, C., Chou, P.M., Yang, X.J., 2010. Glypican 3 has a higher sensitivity than alpha-fetoprotein for testicular and ovarian yolk sac tumour: immunohistochemical investigation with analysis of histological growth patterns. *Histopathology* 56, 750-757.